



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS**



**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y EVALUACIÓN DE
DIETAS PARA EL DESTETE DE LARVAS DE LA
CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*
(PERCOIDEI: SERRANIDAE).**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS**

**PRESENTA
M. en C. CARLOS ALFONSO ALVAREZ GONZÁLEZ**

NOVIEMBRE DEL 2003

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR

DEDICATORIA

A mi amada esposa GLORIA "Pan"

A mi Mamá, Papá, Yel, Peque y Oso

A mi otra familia Sra. Gloria, Sr. Josafat, Doña Luchita, Laura y Nahielli

A mis abuelos "Abito y Abita", los cuales me hubiera gustado que estuvieran con
nosotros

A todos mis amigos

A todos aquellos que creemos en hacer ciencia y que pensamos que la acuicultura
de peces marinos puede llegar a ser una realidad en México.

AGRADECIMIENTOS.

Al CONACYT, por la beca crédito y beca mixta otorgada para mis estudios doctorales. Al proyecto CONACYT número 31666B a cargo de la Dra. Silvie Dumas. Al Instituto Politécnico Nacional y al CICIMAR por permitirme continuar con mi preparación académica y los proyectos institucionales CGPI números 200008, 20010825 y 20020357. Al Programa Institucional de Formación de investigadores por las becas otorgadas. A los proyectos del CIBNOR números PAC 17 y AC 5.8. A la Universidad de Almería donde se me permitió realizar mi estancia de investigación.

A mi comité doctoral, por el cual no hubiese podido realizar esta tesis. Dr. Roberto Civera Cerecedo, Dra. Silvie Dumas, Dr. Francisco Javier Moyano López, Dra. Laura Sánchez Velasco y Dr. Rafael Cervantes Duarte.

A las siguientes personas que me ayudaron en todos los aspectos logísticos y técnicos de la presente tesis: Dr. Hector Nolasco Soria, Dr. Francisco Javier Alarcón López, Dr. Tomás Martínez, Dr. Manuel Díaz López, MC José Luis Ortiz Galindo, MC Martín Oscar Rosales Velázquez, Ing. Victor Carrasco Chávez, MC Tanos Grayeb del Alamo, BM Ruben Esteban García Gómez, MC Ernesto Goytortúa Bores, Ing. Sonia Rocha, Biol. Dolores Astorga, MC Dora Esther Hernández Ceballos y Christian Liñan.

A mis amigos por toda su ayuda, apoyo y comprensión: Robert, Gaby, José Luis, Mary, Víctor, Hector, Martín, Tanos, Juan, Ruben “burro”, Manuel, Triny, Nico, Alfredo, Julio, Christian y Sergio “camarón”.

A mi familia quienes siempre han estado conmigo apoyándome en las buenas y en las malas: Norma, Alfonso, Yel, Pequy y Oso, gracias a todos.

A Gloria, quien siempre ha estado a mi lado apoyándome y ayudándome incondicionalmente en todos los proyectos que he emprendido, y que gracias a ella es que este trabajo pudo concluirse. GRACIAS POR TODO TU AMOR MI VIDA.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
GLOSARIO	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.	xii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Ontogenia de peces	1
1.2. Enzimas digestivas	4
Las proteasas	5
Las amilasas	6
Las lipasas	6
Las fosfatasas ácidas y alcalinas	7
1.3. Estudios de caracterización enzimática	7
1.4. Estudios de digestibilidad <i>in vitro</i>	9
1.5. Uso de alimentos artificiales en larvicultura	11
2. ANTECEDENTES.	14
3. JUSTIFICACIÓN.	21
4. OBJETIVO GENERAL.	22
5. ONTOGENIA DE ENZIMAS DIGESTIVAS EN LARVAS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS EN JUVENILES DE LA CABRILLA ARENERA.	23
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	23
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
5.2.1. Obtención de huevos y crianza larvaria	23
5.2.2. Preparación de las muestras	25
5.2.3. Determinación de la proteína soluble	25
5.2.4. Cálculo de las actividades específicas.	25
5.2.5. Actividad de proteasas.	26
5.2.6. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las proteasas.	26
5.2.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las proteasas.	27
5.2.8. Estudios de inhibición enzimática.	27
5.2.9. La actividad de esterasas no específicas y lipasas.	27
5.2.10. Efecto del pH sobre la actividad de las lipasas.	28
5.2.11. Efecto del SDS sobre la actividad de las lipasas.	28
5.2.12. La actividad de las amilasas.	28
5.2.13. La actividad de las fosfatasas.	29
5.2.14. Caracterización de proteasas alcalinas usando SDS-PAGE.	29
5.2.15. Caracterización de proteasas ácidas usando PAGE.	31
5.2.16. Caracterización de lipasas usando PAGE.	31
5.2.17. Caracterización de lipasas usando SDS-PAGE.	32
5.2.18. Caracterización de amilasas usando PAGE.	32
5.2.19. Caracterización de amilasas usando SDS-PAGE.	32
5.2.20. Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas y ácidas.	33
5.2.21. Análisis estadístico.	33

5.3. RESULTADOS. -----	34
5.3.1. Crecimiento y supervivencia.-----	34
5.3.2. Proteína soluble. -----	35
5.3.3. Ontogenia de las actividades de proteasas alcalinas.-----	35
5.3.4. Ontogenia de las actividades de proteasas ácidas. -----	37
5.3.5. Relación entre proteasa alcalinas y ácidas. -----	38
5.3.6. Ontogenia de proteasas alcalinas usando SDS-PAGE. -----	39
5.3.7. Ontogenia de proteasas ácidas usando PAGE. -----	40
5.3.8. Ontogenia de la actividad tripsina. -----	40
5.3.9. Ontogenia de la actividad quimotripsina. -----	42
5.3.10. Ontogenia de la actividad leucina aminopeptidasa. -----	43
5.3.11. Efecto del pH sobre la actividad esterasa no específica. -----	44
5.3.12. Ontogenia de la actividad esterasa no específica. -----	46
5.3.13. Ontogenia de lipasas usando PAGE.-----	49
5.3.14. Ontogenia de la actividad lipasa. -----	50
5.3.15. Efecto del SDS sobre la actividad y estabilidad de las lipasas. -----	52
5.3.16. Ontogenia de lipasas usando SDS-PAGE.-----	52
5.3.17. Ontogenia de la actividad amilasa. -----	54
5.3.18. Ontogenia de la actividad amilasa usando PAGE y SDS-PAGE. -----	54
5.3.19. Ontogenia de las actividades fosfatasa alcalina y ácida. -----	56
5.3.20. Comparación de actividades enzimáticas entre larvas en inanición y alimentadas. -----	56
5.3.21. Actividades enzimáticas de los alimentos vivos. -----	58
5.3.22. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas. -----	59
5.3.23. Efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas alcalinas.-----	60
5.3.24. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas.-----	61
5.3.25. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas. ---	61
5.3.26. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas ácidas. -----	62
5.3.27. Efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas ácidas. -----	63
5.3.28. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas ácidas. -----	63
5.3.29. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas ácidas. -----	64
5.3.30. Efecto de Inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas y ácidas. -----	64
5.3.31. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteasa alcalina y ácida usando técnicas electroforéticas. -----	66
5.4. DISCUSIÓN. -----	68
5.4.1. Ontogenia enzimática. -----	68
5.4.1.1. Proteasas. -----	68
5.4.1.2. Esterasas no específicas (Lipasas).-----	75
5.4.1.3. Amilasa -----	79
5.4.1.4. Fosfatasa.-----	82
5.4.1.5. Enzimas digestivas en larvas en inanición, alimentadas y presas vivas.-----	83
5.4.2. Caracterización enzimática de proteasas.-----	85
5.5. CONCLUSIONES. -----	92

6. ESTUDIO DE DIGESTIBILIDAD “IN VITRO” DE INGREDIENTES PROTEÍNICOS DE ORIGEN ANIMAL EN JUVENILES DE LA CABRILLA ARENERA.	94
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	94
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	94
6.2.1. Obtención de juveniles.	94
6.2.2. Preparación de los extractos de los juveniles.	94
6.2.3. Selección de ingredientes.	94
6.2.4. Determinación del grado de hidrólisis.	95
6.2.5. Análisis mediante técnicas electroforéticas.	96
6.2.6. Análisis de aminoácidos totales.	96
6.2.7. Análisis estadístico.	97
6.3. RESULTADOS.	98
6.3.1. Digestibilidad <i>in vitro</i> de ingredientes.	98
6.3.2. Análisis electroforéticos.	99
6.3.3. Análisis de aminoácidos totales.	100
6.4. DISCUSIÓN.	105
6.5. CONCLUSIONES.	112
7. UTILIZACIÓN DE DIETAS MICROPARTICULADAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y DESTETE TEMPRANO DE LARVAS DE LA CABRILLA ARENERA.	113
7.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	113
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	113
7.2.1. Crianza larvaria y protocolo de destete.	113
7.2.2. Diseño experimental y fabricación de las dietas microparticuladas.	114
7.2.3. Calidad del agua.	116
7.2.4. Toma y análisis de muestras.	116
7.2.5. Análisis de ácidos grasos.	117
7.2.6. Análisis de aminoácidos.	118
7.2.7. Análisis estadísticos.	119
7.3. RESULTADOS.	120
7.3.1. Calidad del agua.	120
7.3.2. Crecimiento de las larvas.	120
7.3.3. Análisis de supervivencia total, relativa, consumo de alimento y prueba de resistencia.	123
7.3.4. Análisis de ácidos grasos de los juveniles.	124
7.3.5. Análisis de aminoácidos y score químico de los juveniles y dietas.	125
7.4. DISCUSIÓN.	127
7.4.1. Crecimiento y supervivencia.	127
7.4.2. Prueba de Resistencia.	131
7.5. CONCLUSIONES.	133
8. DISCUSIÓN GENERAL	134
9. RECOMENDACIONES	138
10. BIBLIOGRAFÍA	139
11. ANEXO	162

RESUMEN.

El cultivo de peces marinos es una actividad que se ha ido intensificando en diversos países del mundo como Japón, Noruega, España, Francia y Grecia entre muchos otros, lo anterior debido principalmente a la capacidad de producción continua de semilla de buena calidad. Sin embargo, durante la crianza larvaria de estos organismos se requieren presas vivas tales como rotíferos y Artemia, entre otras) para utilizarse en la alimentación, con los problemas que conlleva producir estos alimentos vivos, ya que se necesita hacer una elevada inversión que puede representar hasta el 40 % de los costos totales de producción. Es por esto que los estudios actuales se han encaminado a mejorar la calidad y cantidad de semilla, relacionándose con el proceso de alimentación (ingestión, digestión y absorción), en especial aquellos que permitan conocer la capacidad enzimática digestiva de las larvas, ya que presentan sistemas digestivos no totalmente desarrollados, por lo que este conocimiento permitirá elaborar dietas inertes adecuadas que puedan sustituir parcial o totalmente la utilización de alimento vivo.

El presente trabajo se dividió en tres partes: la primera parte comprende la determinación y caracterización de las enzimas digestivas durante la ontogenia de las larvas de la cabrilla arenosa, alimentadas y en inanición. La segunda parte consiste en la evaluación "*in vitro*" y selección de diferentes fuentes proteínicas para ser utilizadas en la elaboración dietas microparticuladas. La tercera parte del trabajo trata sobre la evaluación nutricional de las dietas microparticuladas para realizar el destete de las larvas en dos tiempos diferentes.

Los resultados de la primera parte mostraron que la capacidad enzimática digestiva de las larvas de la cabrilla arenosa se presenta desde su eclosión y se incrementa con la adición de los alimentos vivos. La actividad de proteasas, lipasas, amilasas y fosfatasas fluctúa a lo largo de la ontogenia y está relacionada a dos procesos principales, la adición y cambios de los alimentos vivos, y los cambios morfofisiológicos durante la transformación de larva a juvenil. La actividad de proteasas ácidas se detectó desde el día 12 días después de la eclosión (DDE), siendo menor a la de las proteasas alcalinas. Para el día 25, la actividad de proteasas ácidas fue proporcionalmente mayor a la de las proteasas alcalinas, por lo que se plantea la posibilidad de realizar un destete temprano a partir del día 16 DDE. Para la segunda parte del trabajo, los ingredientes probados mostraron un alto grado de hidrólisis utilizando los extractos enzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa. Asimismo, la electroforesis y la cuantificación de aminoácidos libres denotaron las mayores concentraciones en la harina de calamar, la harina de sangre de res y un hidrolizado comercial de pescado, por lo que fueron seleccionadas para la fabricación de dietas microparticuladas. Los ingredientes seleccionados se utilizaron para sustituir parcialmente la harina de pescado y se incluyeron al 15 % en tres dietas, con las que se realizaron destetes a los 17 y 22 DDE. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las dietas, donde la harina de calamar y el hidrolizado de pescado permitieron obtener los mayores crecimientos y supervivencias, mientras la dieta con harina de sangre de res provocó bajo crecimiento y altas mortalidades ya que aparentemente presentó un efecto antinutricional hacia las larvas. Al comparar los destetes, las mejores tasas de crecimiento y supervivencia se obtuvieron al realizar el destete 22 DDE, por ello, este tiempo se considera el más adecuado para sustituir la alimentación con Artemia adulta. Se requieren realizar más investigaciones para mejorar estos resultados, como utilizar otro tipo de dietas microencapsuladas o ingredientes más digeribles y asimilables si se pretende sustituir totalmente la utilización del alimento vivo y obtener mejores supervivencias.

ABSTRACT

Intensive culture of marine fish has been developed in many nations, including Japan, Norway, Spain, France, and Greece, among many others. Previous studies have focused on improving the capacity to achieve continuous production of good quality seed. Nevertheless, during the rearing of these organisms, live prey, such as rotifers and *Artemia*, are required as diet for the larvae. Production of these live prey represents up to 40% of fish production cost. Recent research to improve the quality and quantity of fish production by understanding the process of feeding (ingestion, digestion, and absorption), with emphasis on the digestive enzymatic capabilities of larvae, is important because larvae do not have fully developed digestive systems. The impetus to increase knowledge about suitable inert diets to partially or totally replace live feed would reduce this expensive part of the operation.

This thesis is divided into three parts: (1) Enzymatic characterization (biochemical approach) during the ontogeny of spotted sand bass larvae using live feeds (rotifers and *Artemia*). (2) In vitro evaluation by means of a pH-Stat system and the selection of several animal protein sources as ingredients in inert diets. (3) Evaluation of the nutritional value of three micro-particulate diets for weaning larvae at two different stages of development.

The results of Part 1 showed that the digestive enzyme capacity of spotted sand bass larvae appeared from hatching and increased with the addition of live feed. Protease, lipase, amylase, and phosphatase activities fluctuated throughout ontogeny. These fluctuations have been related to two main processes: morpho-physiological changes and the addition of live prey. The activity of acid proteases was detected at day 12 after hatching, being lower than alkaline proteases. After day 25, activity of acid proteases was relatively high compared to alkaline proteases. From this result, it is possible that early weaning can be achieved after day 16.

The results of Part 2 showed that the tested ingredients had a high degree of hydrolysis, using enzymatic extracts of juvenile spotted sand bass. In addition, electrophoresis and quantification of free amino acids indicated greater concentrations of amino acids in squid meal, cattle blood meal, and fish hydrolysate. Therefore, these three ingredients were evaluated in the third part of this study.

The selected ingredients were used at the 15% dietary level to replace fish meal in three inert diets. We tested these diets with spotted sand bass larvae at two weaning days after hatching (17 and 22). The results showed significant differences among diets. Squid meal and fish hydrolysate produced higher growth and final and relative survival compared to the cattle blood meal diet. This ingredient produced the lowest growth, lowest feed consumption, and highest mortality. Apparently, this ingredient had an anti-nutritional effect. The best growth and survival were obtained when weaning was initiated at 22 days. This time seems to be appropriate for eliminating *Artemia* adult in the larvae diet. Research is still needed to improve results of substitution, such as microcapsules and other types of digestible ingredients, if it seems feasible to completely replace live feed during rearing of sand bass larvae.

GLOSARIO.

a-amilasa: Enzima digestiva (alfa-1,4 glucano 4 glucanohidrolasa) que cataliza la hidrólisis de enlaces alfa 1,4 internos en polisacáridos que contengan 3 o más glucosas unidas por enlace alfa 1,4 (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Absorción: Transporte de los productos de la digestión desde el tracto digestivo hasta la sangre TR difusión facilitada (esp), difusión simple(esp), pinocitosis(esp), transporte activo(esp) (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Ácido graso: Ácido carboxílico de cadena larga, de fórmula RCOOH, cuando R tiene al menos 8-10 átomos de carbono. Los ácidos grasos cumplen misiones fisiológicas importantes como ingredientes de la estructura de triacilglicérido, fosfo y glicolípidos, y algunos derivados como mensajeros intracelulares (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Ácido graso esencial: Ácido graso que no puede ser biosintetizado por un organismo determinado, y que debe ser suministrado en la dieta. Los mamíferos carecen de enzimas capaces de introducir dobles enlaces en la cadena carbonada después del C-9, por lo que no pueden sintetizar los ácidos linoléico (18:2), linolénico (18:3) y araquidónico (20:4), y son considerados esenciales (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Ácido graso poliinsaturado: Ácido graso de cadena larga con múltiples enlaces dobles. Los más importantes son los ácidos linoléico, linolénico y araquidónico. Algunos de ellos, sobre todo los pertenecientes a la familia n-6 – como el linoléico –, desempeñan un papel importante en el control de los niveles de colesterol y, por lo tanto, en la disminución de los riesgos cardiovasculares (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Actividad proteolítica: capacidad de las enzimas de hidrolizar enlaces peptídicos en las proteínas (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Alimento artificial: Alimento que contiene nutrientes en cantidades y proporciones que satisfacen necesidades fisiológicas de los animales especificadas por autoridades reconocidas en nutrición animal (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Alimento completo: Alimento nutricionalmente adecuado para un animal específico y para un determinado estado fisiológico, su composición permite ser administrado como la única dieta y es capaz de mantener la vida o promover la reproducción o ambos sin el consumo de ninguna otra sustancia adicional excepto agua (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Alimento formulado: Alimento compuesto por dos o más ingredientes proporcionados, mezclados y procesados de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Alimento vivo: Alimento conformado por organismos vivos Ej.: microalgas, artemias, copépodos (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Aminoácido: Compuesto orgánico que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo en su estructura; principal componente de las proteínas, por lo que su distribución y concentración determina las propiedades de estas (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

Aminoácido esencial: Aminoácido que no puede ser sintetizado o que se sintetiza en cantidades insuficientes para cubrir los requerimientos óptimos de una determinada especie, por lo tanto debe ser suministrado en la dieta TR leucina (esp), isoleucina (esp), lisina (esp), metionina (esp), triptófano (esp), treonina (esp), valina (esp), arginina (esp), histidina (esp), metionina (esp), cistina (esp), fenilalanina (esp), tirosina (esp) (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

- Análisis bromatológico:** Análisis cuantitativo realizado a alimentos o ingredientes de alimentos para conocer su contenido en lípidos, proteínas, fibra, humedad, cenizas y carbohidratos (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Asimilación:** Proceso de transformación de sustancias ajenas en sustancias propias del protoplasma; es distinto en los organismos autótrofos que en los heterótrofos (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).
- Caseína:** Proteína fundamental de la leche. Nota: ingrediente utilizado como proteína de referencia en estudios de nutrición (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Coenzima:** Molécula orgánica que resulta esencial en muchas reacciones catalizadas por enzimas, en ocasiones contiene una vitamina como componente (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Deshabitación:** Proceso de sustitución de presas vivas por alimento inerte (destete).
- Dieta:** Régimen de alimentación controlado, término referido al alimento balanceado (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Digestión:** Proceso de degradación química de los alimentos ingeridos a formas más sencillas, que puedan ser absorbidas y asimiladas por el organismo. Puede ser extracelular, como en la mayor parte de los animales, o intracelular como en el caso de la captura fagocítica en protozoos y celentereos (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).
- Digestión:** Proceso fisiológico que se basa en la transformación de los alimentos en el aparato digestivo a través de una hidrólisis enzimática que fracciona los polímeros de los nutrientes en pequeñas moléculas capaces de ser asimiladas por las células del intestino y transportadas al torrente circulatorio para su distribución (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Electroforesis:** Técnica para separar moléculas en una matriz (agarosa o poliacrilamida) de acuerdo a su carga eléctrica y tamaño (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Endoproteinasa:** Enzima que hidroliza enlaces peptídicos en la parte interna de la cadena polipeptídica (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Enlace peptídico:** Enlace que une a los aminoácidos para formar proteínas, se origina por la condensación del grupo alfa-amino de un aminoácido con el grupo alfa-carboxílico de otro aminoácido con pérdida de agua (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Enzima:** Biomolécula tanto proteína como RNA que cataliza una reacción específica y acelera la velocidad de las reacciones biológicas (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Hidrólisis:** Reacción química en la cual el agua interacciona con otra sustancia para formar una o más sustancias nuevas (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Hidrolizado:** Producto de la hidrólisis química y/o enzimática (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Inhibidor enzimático:** Sustancia que en contacto con las enzimas inhibe su actividad de manera reversible o irreversible
- Isoenzima:** Múltiples formas de una enzima cuya síntesis es controlada por más de un gen (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Maricultivo:** Cultivo, manejo y cosecha de organismos marinos en su hábitat natural o en sistemas de cultivo concebidos para tal efecto (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Nutrición:** Proceso por el que los organismos utilizan el alimento para la obtención de la energía relativa al crecimiento, mantenimiento y reparación: Los dos tipos principales son la nutrición autótrofa y la heterótrofa (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

- Nutriente: Elemento del agua o del suelo que plantas y animales son capaces de ingerir como alimento (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).
- Pre-aminoácido: Precursor del esqueleto carbonado como el α -oxiácido derivado de productos intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico (Lehninger, 1984).
- Requerimiento: Cantidad mínima de un nutriente que logra el máximo de crecimiento y una salud óptima (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Semilla: Larva o juvenil usado con fines de cría, proveniente del medio natural o de los centros de producción de larvas (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Sistema de recirculación: Sistema cerrado o parcialmente cerrado empleado en la acuicultura en el cual los efluentes del sistema son tratados para su reutilización (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).
- Sustrato: Material que recubre el fondo de un ambiente acuático, puede ser usado para describir nutrientes presentes en procesos metabólicos o como medio para crecimiento bacteriano. En bioquímica: compuesto biológico que es transformado por la acción de las enzimas (Chong-Carrillo y Vega-Villasante, 2003).

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Comparación de los tipos de obtención del alimento entre la ontogenia indirecta y ontogenia directa. -----	1
Figura 2. Sistema cerrado para la crianza de larvas de la cabrilla arenera. -----	23
Figura 3. Peso seco promedio ($\mu\text{g}/\text{ind.} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$) de larvas de la cabrilla arenera durante su cultivo. -----	34
Figura 4. Comparación del peso seco ($\mu\text{g}/\text{ind.} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$) entre larvas alimentadas y en inanición. -----	34
Figura 5. Concentración de proteína soluble ($\text{mg}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$) en larvas de la cabrilla arenera alimentadas y en inanición. -----	35
Figura 6. Actividad de proteasas alcalinas durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$).-----	36
Figura 7. Actividad de proteasas ácidas durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$). -----	37
Figura 8. Comparación de las actividades de proteasas ácidas y alcalinas durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$).-----	38
Figura 9. Zimograma de la ontogenia de la actividad proteasa alcalina en condiciones desnaturalizantes. M: marcador de pesos moleculares en dalton: 1) albúmina bovina sérica, 66000; 2) ovoalbúmina, 45000; 3) gliceraldehído 3P deshidrogenasa, 36000; 4) anhidrasa carbónica, 29000; 5) tripsinógeno, 24000. Los números superiores indican los días después de la eclosión; rot: rotífero; nArt: nauplio de Artemia; Art: Artemia adulta. -----	39
Figura 10. Zimograma de la ontogenia de la actividad proteasa ácida en condiciones nativas. Los números indican los días después de la eclosión; PP: Pepsina porcina. -----	40
Figura 11. Actividad tripsina durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{mg}$ proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$). -----	41
Figura 12. Actividad quimotripsina durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{mg}$ proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$). -----	42
Figura 13. Actividad leucina aminopeptidasa durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{mg}$ proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$). -----	43
Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad lipasa utilizando. a) PNF-acetato, b) PNF-caprato y c) PNF-estearato. -----	45
Figura 15. Comparación de la actividad esterasa no específica de larvas en inanición con los ocho sustratos probados. -----	46
Figura 16. Comparación de la actividad esterasa no específica entre larvas en inanición y alimentadas para los tres sustratos probados. -----	47
Figura 17. Actividad de esterases no específicas de larvas criadas por 30 días usando tres diferentes sustratos (U/mg de proteína $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$). a) PNF-acetato, b) PNF. caprato y c) PNF-estearato. -----	48
Figura 18. Actividad de esterases no específicas de larvas criadas por 30 días usando tres diferentes sustratos (PNF: p-nitrofenil-) expresada en $\text{mU}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$ ($n=3$). -----	49
Figura 19. Zimograma en condiciones nativas de la ontogenia de la actividad lipasa. a) inanición; b) alimentada. Los números en la parte superior indican los días después de la eclosión y los números laterales indican los r_f 's de las bandas de actividad. -----	50
Figura 20. Actividad lipasa durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm \text{desv. est.}$), b) Actividad específica ($\text{mU}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$).-----	51
Figura 21. Estabilidad de las lipasas a diferentes concentraciones de SDS y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenera (Promedio $\pm \text{desv. est.}$, $n=3$) -----	52

Figura 22. Zimograma en condiciones desnaturalizantes de la ontogenia de la actividad lipasa. a) inanición; b) alimentada. Los números superiores indican los DDE. LP: lipasa porcina; rot: rotífero; Art: Artemia adulta. -----	53
Figura 23. Actividad amilasa durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., n=3), b) Actividad específica (U/larva $\pm$ desv. est., n=3). -----	54
Figura 24. Zimograma de la ontogenia de la actividad amilasa de la cabrilla arenosa. a) PAGE de larvas en inanición; b) SDS-PAGE de larvas alimentadas. rot: rotífero. Los números superiores indican los días después de la eclosión. Los números laterales indican los pesos moleculares (Kilodaltons); 1) fosforilasa b (94), 2) albúmina bovina (67), 3) albúmina de huevo (43), 4) anhidraza carbónica (30), 5) tripsinógeno (24) y 6) inhibidor de tripsina de soya (20). -----	55
Figura 25. Actividades fosfatasa ácida y alcalina durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., n=3), b) Actividad específica (mU/larva $\pm$ desv. est., n=3). -----	57
Figura 26. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas de los juveniles (45 DDE) de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., n=3). -----	60
Figura 27. Estabilidad de proteasas alcalinas a diferentes pH's y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa. -----	60
Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas de los juveniles de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., n=3). -----	61
Figura 29. Estabilidad de proteasas alcalinas a diferentes temperaturas y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa. -----	62
Figura 30. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., n=3). -----	62
Figura 31. Estabilidad de proteasas ácidas a diferentes pH's y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa. -----	63
Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., n=3). -----	63
Figura 33. Estabilidad de proteasas ácidas a diferentes temperaturas y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa. -----	64
Figura 34. Estudio de Inhibición de las proteasas alcalinas, metal proteasas y proteasas ácidas presentes en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa. -----	65
Figura 35. Estudio de Inhibición de las proteasas alcalinas, metal proteasas y proteasas ácidas de bovino (1 mg/ml). -----	65
Figura 36. Estudio de inhibición electroforético de las proteasas alcalinas presentes en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa. JC: juvenil de cabrilla, las otras siglas corresponden a los nombres abreviados de los inhibidores. -----	66
Figura 37. Estudio de Inhibición electroforético de a) pepsina porcina (1 mg/ml) y b) pepsina presente en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa. PP: pepsina porcina; PPI: pepsina porcina + inhibidor; JC: juvenil de cabrilla; JCI: juvenil de cabrilla + inhibidor. -----	67
Figura 38. Comparación de los estadios de desarrollo en el tracto digestivo de varias especies de peces. PA: actividad proteasa alcalina; MO: apertura de boca; YR: absorción de vitelo; FS: estómago funcional; C: Sistema digestivo completo; D: Diferenciación del sistema digestivo. -----	74
Figura 39. Proceso de digestión de la caseína por acción de los extractos enzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa. -----	99
Figura 40. Concentración de aminoácidos liberados durante la digestión ácida y alcalina <i>in vitro</i> de los ingredientes proteínicos utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa (Promedio $\pm$ desv. est., n=3). -----	102

Figura 41. Ajuste al modelo lineal de la liberación de aminoácidos totales durante la digestión ácida y alcalina <i>in vitro</i> por ingrediente proteínico utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera. a) Caseína; b) Hidrolizado comercial de pescado; c) Harina de sardina; d) Harina de langostilla; e) Harina de calamar; f) Harina de sangre de res. -----	103
Figura 42. Longitudes notocordal y/o patrón (promedio $\pm$ desv. est.) de las larvas alimentadas con las DMP a partir de los 17 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. -----	121
Figura 43. Longitudes notocordal y/o patrón (promedio $\pm$ desv. est.) de las larvas alimentadas con las DMP a partir de los 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. -----	121
Figura 44. Pesos (promedio en mg $\pm$ desv. est., n=3) de las larvas destetadas con las DMP a partir de los 17 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. -----	122
Figura 45. Pesos (promedio en mg $\pm$ desv. est., n=3) de las larvas destetadas con las DMP a partir de los 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. -----	123

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de las proteasas por familias -----	5
Tabla 2. Clasificación de inhibidores empleados en la caracterización de proteasas en función de su mecanismo de acción y peso molecular -----	9
Tabla 3. Actividades enzimáticas digestivas reportadas para larvas de peces. Signo positivo (+) indica presencia, signo negativo (-) indica ausencia y (NE) indica no ensayado. ----	15
Tabla 4. Tabla de alimentación para la cría de larvas de cabrilla arenera a una densidad inicial de 48 ± 3 larvas/l.-----	24
Tabla 5. Protocolo de preparación de los geles de electroforesis. -----	29
Tabla 6. Composición del marcador de peso molecular (LMW). -----	30
Tabla 7. Actividad enzimática de huevos y larvas (en inanición y alimentadas) de la cabrilla arenera hasta el día 4 después de la eclosión. -----	58
Tabla 8. Actividades enzimáticas de los alimentos vivos utilizados para el larvicultivo de la cabrilla arenera (promedio $\pm$ desv. est.). -----	59
Tabla 9. Porcentaje de inhibición (%) de proteasas digestivas presentes en diferentes peces usando inhibidores específicos (Tomado de Moyano et al., 1998, modificado). -----	89
Tabla 10. Análisis químico de los Ingredientes utilizados en los estudios de digestibilidad “ <i>in vitro</i> ” para juveniles de cabrilla arenera. -----	98
Tabla 11. Comparación del grado de hidrólisis (GH %) y porcentaje de digestibilidad <i>in vitro</i> de diversos ingredientes de origen proteínico, utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (Promedio $\pm$ desv. est., n=3). -----	99
Tabla 12. Comparación de la concentración parcial de aminoácidos liberados a partir de la digestión ácida y alcalina <i>in vitro</i> de los ingredientes proteínicos, utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (Promedio $\pm$ desv. est., n=3).-----	101
Tabla 13. Tasa de liberación de aminoácidos por ingrediente proteínico a partir de la digestibilidad ácida y alcalina <i>in vitro</i> , utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (n=3). -----	104
Tabla 14. Esquema de alimentación durante la crianza de larvas de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> . -----	114
Tabla 15. Formulación y composición química de las dietas microparticuladas para el destete de las larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> . DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. -----	116
Tabla 16. Longitudes notocordal y/o patrón (promedio en mm $\pm$ desv.est., n=3) de las larvas destetadas con las DMP a los 17 y 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado; DDE – Días después de la eclosión. -----	120
Tabla 17. Pesos (promedio en mg $\pm$ desv.est., n=3) de las larvas destetadas con las DMP a los 17 y 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado; DDE – Días después de la eclosión. -----	122
Tabla 18. Porcentajes de supervivencia total, supervivencia relativa, y consumo de alimento (g/día) de las larvas destetadas. DC = Dieta con harina de calamar; DS = Dieta con harina de sangre; DH = Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. D17= Destete a los 17 DDE; D22= Destete a los 22 DDE; DDE = días después de la eclosión.-----	124
Tabla 19. Concentraciones (μ g/mg de pez en base seca $\pm$ desv. est.) y proporciones de los ácidos grasos encontrados en los juveniles alimentados con las tres DMP en cada destete. DC = Dieta con harina de calamar; DS = Dieta con harina de sangre; DH = Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. D17 = sustitución a los 17 días después de la eclosión; D22 = Sustitución a los 22 días después de la eclosión; DDE= días después de la eclosión.----	125
Tabla 20. Perfil de aminoácidos (mg/100 mg de materia seca) y score químico de las DMP y juveniles de la cabrilla arenera. -----	126

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Ontogenia de peces.

Durante el desarrollo de los peces se han descrito dos tipos de ontogenia (Balon, 1984) (Fig. 1), a) **ontogenia indirecta**, que se caracteriza por tener cinco períodos, 1) embrionario, 2) larvario, 3) juvenil, 4) adulto y 5)

senectud, y b) **ontogenia directa**, que carece de un período larvario, por lo que al eclosionar el organismo ya presenta todas las características de un juvenil, como es el caso de los poecilidos y algunas especies de cíclidos, entre otros (Kendall *et al.*, 1984).

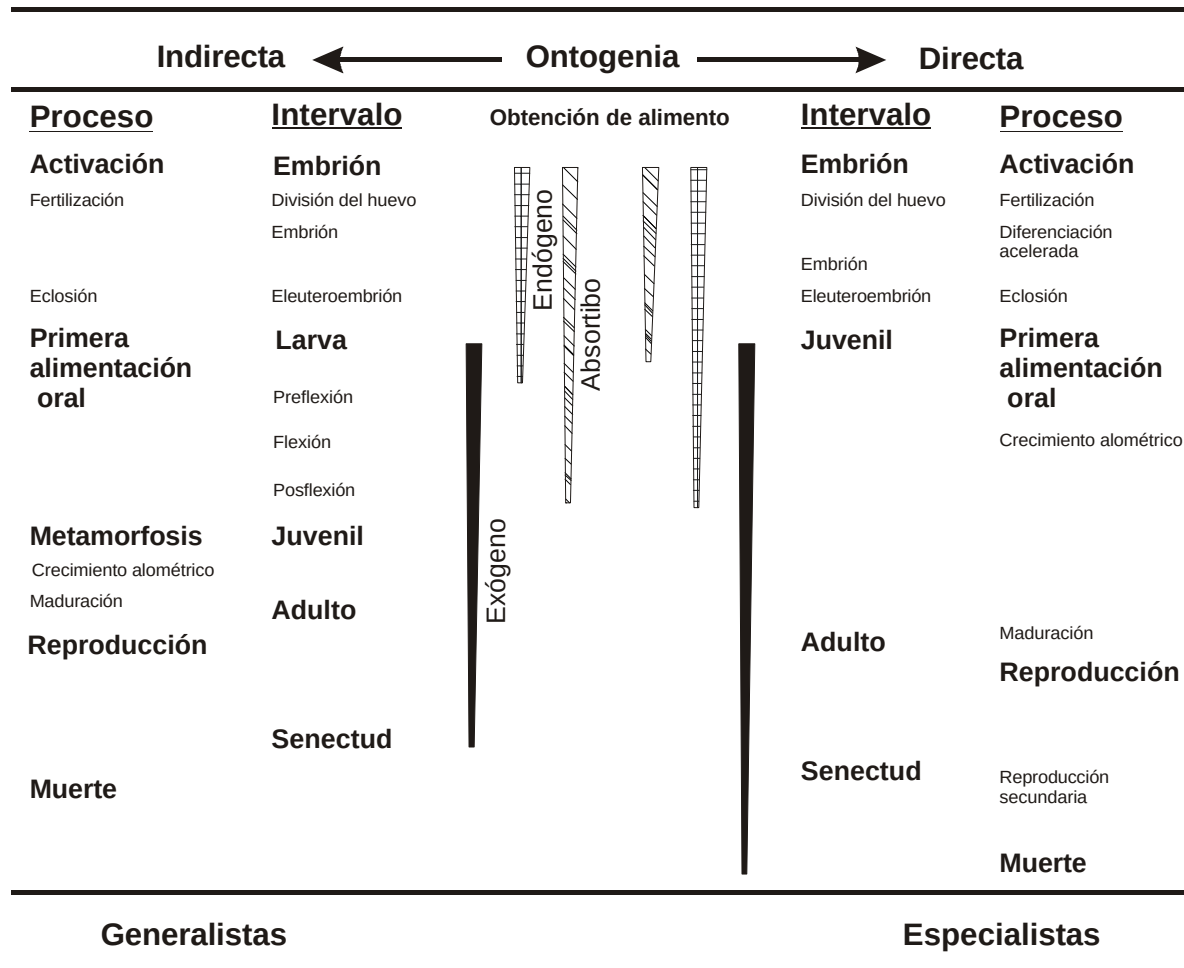


Figura 1. Comparación de los tipos de obtención del alimento entre la ontogenia indirecta y la ontogenia directa (tomada de Balon, 1984).

Es importante resaltar que las siguientes descripciones son aplicadas exclusivamente a los peces que presentan **ontogenia indirecta**, ya que son las especies que presentan una problemática más compleja durante su

desarrollo, y durante el proceso de alimentación y nutrición.

1) **Período embrionario.** Inicia una vez que el oocito ha sido fecundado y termina cuando la larva ha absorbido completamente el vitelo y glóbulo de aceite. Este período se divide en tres

fases: a) la fase de segmentación, que inicia cuando se fecunda el óvulo y termina antes del cierre del blastoporo, b) la fase embrión, que inicia con el cierre del blastoporo y termina con la eclosión del huevo, y c) la fase eleuteroembrión (embrión libre), que inicia con la eclosión del huevo y termina cuando se da la completa absorción del vitelo y glóbulo de aceite (Balon, 1984).

En general, los huevos y eleuteroembiones presentan características comunes como son: diámetro del huevo pequeño, tiempos de eclosión cortos, un vitelo restringido que dura poco tiempo, por lo que la alimentación exógena tiene que realizarse antes que el organismo este totalmente formado.

En el caso de los huevos, las estructuras más importantes son: el corion, que es una capa lipoproteínica que protege al cigoto; el vitelo, que es una reserva de origen materno, la cual contiene glucógeno y aminoácidos libres que son usados principalmente como fuente de energía (Rønnestad *et al.*, 1992; Fyhn, 1993; Rønnestad *et al.*, 1994; Finn y Fyhn, 1995; Fyhn y Govoni, 1995); el glóbulo de aceite, que contiene triacilglicéridos, los cuales son usado como fuente de energía y fuente de ácidos grasos esenciales (Parra *et al.*, 1999); el espacio perivitelino que permite la absorción del agua después de la fertilización, el cual separa el corion del embrión, (Yamamoto y Kobayashi, 1992); el micrópilo, que es un poro por el cual el espermatozoide penetra y fertiliza el huevo.

2) Período larvario. Este período comprende tres fases: a) la fase preflexión, que inicia a partir de la completa absorción de las reservas endógenas y termina hasta antes del inicio de la flexión de la notocorda, b) la fase flexión, que inicia a partir de la flexión de la notocorda y termina hasta la completa formación de la placa hipúrica, y c) la fase posflexión, que inicia al estar completamente formada la placa hipúrica

y termina con la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares. En esta fase, la larva esta casi completamente formada, aunque todavía no presenta todas las características morfológicas finales de un juvenil; sin embargo, su capacidad de búsqueda y captura es total y puede alimentarse de presas de mayor talla (Kendall *et al.*, 1984 modificado por Ortiz-Galindo, 1991).

En el momento de la eclosión de los embriones, el sistema digestivo esta compuesto de un tubo recto indiferenciado; al finalizar la absorción del saco vitelino y el glóbulo de aceite, el tubo se segmenta dando paso a la aparición de válvulas musculares, la bucofaringe y las porciones anterior, media y posterior que paulatinamente se irán diferenciando histológica y funcionalmente (Govoni, 1980). Además, el hígado y el páncreas están presentes en el momento de la eclosión y son funcionales al finalizar la absorción vitelina. Es así, que al finalizar el período larvario el desarrollo del estómago, intestino, ciegos pilóricos y demás órganos que participan en el proceso de digestión están completos, aunque esta diferenciación puede tomar de 15 hasta 60 días dependiendo de la especie (Cousin *et al.*, 1987).

Inicialmente, el canal alimentario se desarrolla a partir de las células columnares endodérmicas por arriba de la sección del vitelo (Devillers, 1961). Al eclosionar, el canal alimentario es un tubo recto que pasa por encima del saco vitelino y está cerrado hacia la boca y ano en muchas especies; además, es histológicamente indiferenciado a lo largo del tubo (Engen, 1968; Tanaka 1969a; Fukusho, 1972; Umeda y Ochiai, 1973; Vu, 1976). El tubo incipiente permanece sin cambios hasta la completa absorción del vitelo y el glóbulo de aceite; en este momento el tubo se segmenta por válvulas musculares en bucofaringe, tubo anterior, medio y posterior (Kostomarova, 1962; Engen, 1968; Tanaka, 1969a y

1969b; Fukusho, 1972; Umeda y Ochiai, 1973; Govoni, 1980; O'Connell, 1981). Con excepción de algunos peces, entre ellos salmónidos, gasteroidéos y cíclidos, la mayoría de las larvas carecen de un estómago morfológicamente funcional, por lo que el tubo anterior y medio pueden expandirse y funcionar para almacenar el alimento (Tanaka 1969a y b; Vu, 1976; Govoni 1980; Watanabe y Sawada, 1985).

Las tres secciones del tubo incipiente son histológicamente y funcionalmente distintas (Richards y Dove, 1971; Tanaka, 1971, Umeda y Ochiai, 1973; O'Connell, 1976 y 1981; Vu, 1976; Theilacker, 1978; Govoni, 1980; Watanabe, 1981). En el tubo anterior se observa una simple capa de células epiteliales cuboidales entremezcladas con líneas de células mucosas. Las células mucosas están más densamente distribuidas en la parte anterior que en la posterior del tubo anterior en algunas especies (Watanabe y Sawada, 1985). En el tubo medio, se observa una sola capa de células epiteliales columnares con un borde estriado muy bien definido, cubierto de microvellosidades sostenidas en redes lineales (Iwai, 1968a y b; Iwai y Tanaka, 1968a y b). Asimismo, en el tubo posterior se observa una capa simple de células columnares con microvellosidades no sostenidas por redes lineales.

Morfológicamente, en el intestino anterior es posible distinguir un epitelio formado por una capa sencilla de células intercaladas con células secretoras de mucus, en tanto que en los intestinos medio y posterior existe una capa sencilla de células provistas de borde estriado (microvellosidades), y sujetas por tejido conectivo. La parte anterior constituye el 60-75% de la longitud total del tubo digestivo. En cuanto al segundo segmento, las células absorbivas muestran vacuolas supranucleares electrodensas, procedentes de procesos de pinocitosis de proteínas. El tercer

segmento intestinal representa un 5% de la longitud intestinal y dadas las características de sus entericitos, menor cantidad de microvellosidades, parece intervenir principalmente en procesos de recuperación de agua, y de iones (Govoni *et al.*, 1986).

Desde el punto de vista de la alimentación, la larva se enfrenta a la necesidad de aprender a cazar con rapidez, y que además se complica aún más ya que no tienen un sistema digestivo completamente formado. Durante este período, el desarrollo del canal alimentario abarca cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos que están sincronizados por procesos genéticos y ambientales (Rønnestad *et al.* 2001).

3) **Período juvenil.** En este período el cual la larva debe pasar por un período de cambio (transformación) para concluir con todos los cambios morfofisiológicos, aunque no ha iniciado con la etapa reproductora. No debe confundirse con el término de metamorfosis, ya que solamente unos cuantos tipos de peces, como las anguilas y los peces planos sufren este cambio. Este período se divide en dos fases, a) la fase prejuvenil, que se inicia a partir de la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares y termina antes de que las escamas cubran completamente el cuerpo y b) la fase juvenil, que se inicia una vez que el cuerpo esta totalmente cubierto de escamas, y termina hasta antes de la formación de las gónadas (Hubbs, 1958 modificado por Ortiz-Galindo, 1991).

Durante este período, la morfología del sistema digestivo permanece sin cambios, mostrando cierta similitud con el de los vertebrados superiores (Barrington, 1957; Kapoor *et al.*, 1975; Fange y Grove, 1979). La mayoría de las larvas se transforman entre los primeros 20 a 60 días después de la eclosión. Sin embargo, algunas especies precoces pueden considerarse juveniles con tan sólo unos cuantos días

de haber eclosionado, como el caso del brema roja (*Pagrus major*), mientras que en peces como las anguilas americanas, puede tomarles hasta un año la metamorfosis y subsiguiente transformación a juvenil. Se consideran juveniles cuando los elementos merísticos están completamente formados (huesos y rayos de las aletas), se presenta el patrón de escamación, el sistema digestivo está completamente formado, y puede alimentarse de forma óptima.

4) **Período adulto.** Inicia al detectarse la aparición de las gónadas, así como los caracteres primarios y secundarios para la reproducción. Este período puede iniciar a los pocos meses de edad o hasta varios años después, y depende de la especie. Por ejemplo, en la tilapia que madura a los 3 ó 4 meses después de haber nacido, o como en el lobina gigante *Stereolepis gigas* que tarda hasta 20 años en madurar. Asimismo, un aspecto relevante de este período, es que la tasa de crecimiento disminuye considerablemente, debido a que gran parte de la energía que se utilizaba para crecimiento se canaliza para la formación de las gónadas y de los gametos.

5) **Período senectud.** La capacidad reproductiva ha disminuido o finalizado; asimismo, la tasa de crecimiento se ha reducido considerablemente para dar paso a la muerte del organismo (Kendall *et al.*, 1984).

Estos períodos anteriormente descritos, sirven de base para entender el complejo desarrollo por lo que pasan los peces durante su vida, en especial aquellos que presentan ontogenia indirecta. Sin embargo, estos aspectos morfofuncionales no podrían entenderse si no se estudian los procesos bioquímicos básicos que permiten al organismo obtener la energía necesaria para mantenerse y crecer hasta completar su total desarrollo.

Para completar su desarrollo, los peces como la mayoría de los vertebrados superiores, requieren de alimentarse adecuadamente (ingestión del alimento), y nutrirse (digestión de combustibles y asimilación de los nutrientes).

1.2. Enzimas digestivas.

El presente trabajo se enfocará principalmente en la nutrición de larvas y juveniles, por lo que una vez que el alimento es tragado, inicia el proceso de digestión, para lo que se requiere la acción de una serie de enzimas y otras sustancias que permitirán al organismo obtener los nutrientes necesarios y ser asimilados. Para entender este aspecto es imprescindible el papel que juegan las enzimas digestivas.

Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan la rapidez o la velocidad de una reacción, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger, 1984; Mathews y Van Holde, 1998):

1. Óxido reductasas: que catalizan reacciones de oxidación-reducción.
2. Transferasas: que catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3. Liasas: que catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones a un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
4. Isomerasas: que catalizan reordenamientos intramoleculares.
5. Ligasas: que catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.
6. Hidrolasas: que catalizan rupturas hidrolíticas.

En el caso particular de las enzimas digestivas, muchas de ellas son del grupo 6, y se han dividido en los siguientes grupos en función del tipo de nutriente que hidrolizan:

Las proteasas.

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas, y están presentes en muchos organismos (Dixon Y Webb, 1979). Las proteasas están implicadas en procesos como la digestión de proteínas, la activación de proenzimas y prehormonas y muchos otros (Stroud, 1975).

La clasificación de las proteasas, al ser hidrolasas específicas de enlaces peptídicos, se agrupan bajo el código EC 3.4. Dentro de ellas, existen dos subgrupos: las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína), y se agrupan bajo la categoría EC 3.4.11-19. Las endopeptidasas, hidrolizan enlaces peptídicos internos que pertenecen a la categoría 3.4.21-24. Asimismo, se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, donde se reconocen 4 grupos principales:

1. *Serina-proteasas* (EC 3.4.21): que poseen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y ácido aspártico.

2. *Cisteina-proteasas* (EC 3.4.22): que se caracterizan por la presencia del grupo cisteína (-SH) en su centro catalítico.

3. *Proteasas ácidas o aspárticas* (EC 3.4.23): que se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo, y poseen máxima actividad a pH ácido.

4. *Metal-proteasas* (EC 3.4.24): poseen un residuo de ácido glutámico en el centro activo, y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

Para profundizar en la clasificación se han propuesto 6 grupos en función de su secuencia aminoacídica (Tabla 1), las cuales comparten hasta un 50% de esta secuencia (Dumermuth *et al.*, 1991).

Tabla 1. Clasificación de las proteasas por familias (Tomada de Alarcón, 1997 y modificado de Neurath, 1989).

Clase	Enzima	Origen
<i>Serina I</i>	tripsina	páncreas
	quimotripsina	páncreas
<i>Serina II</i>	subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cisteina</i>	papaína	<i>Papaya latex</i>
	quimopapaína	<i>Papaya latex</i>
	ficina	<i>Ficus latex</i>
	bromelaína	<i>Ananas comosus</i>
	catepsina B	varios tejidos
<i>Ácidas</i>	pepsina	jugo gástrico
	quimosina	jugo gástrico (ind.jóvenes)
	catepsina D	Hígado, bazo
<i>Metal I</i>	carboxipeptidasa A	Páncreas bovino
<i>Metal II</i>	termolisina	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>

Dentro del grupo de las endoproteasas se encuentran la *pepsina* (EC 3.4.23.1), *gastricina* (EC 3.4.23.3) y la *quimosina* o *renina* (EC 3.4.23.4) que son proteasas ácidas presentes en el jugo gástrico de muchos organismos. De éstas, la proteasa ácida más importante

es la pepsina, la cual es una enzima aspártica que hidroliza a su máxima capacidad cuando se encuentra a pH ácido (2) y requiere que el residuo 2 de la cadena peptídica sea fenilalanil, tirosil o triptofanil. Este tipo de enzimas han sido purificadas con bastante éxito a

partir de extractos derivados de vacas, pollos y peces. En el intestino de muchas especies se ha detectado otro tipo de enzimas que funcionan a pH alcalino como la *tripsina* (EC 3.4.21.4.) y la *quimotripsina* (EC 3.4.21.1). Estas enzimas son las serina proteasas (endopeptidasas) más ampliamente estudiadas, ya que participan fuertemente en la digestión de proteínas en todos los animales. Por supuesto no son las únicas y existen muchos tipos que también están involucradas dentro de este proceso, aunque en menor porcentaje. La tripsina es una endopeptidasa que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 está conformado por arginina o lisina. Mientras que la α -quimotripsina es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptofano (Whitaker, 1994). También actúa sobre amidas y ésteres. Las *catepsinas* son enzimas relacionadas con los procesos de digestión intracelular.

En el caso de las exoproteasas, se pueden mencionar las *aminopeptidasas* (EC 3.4.11) las cuales catalizan la hidrólisis de los restos aminoácidos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965). Entre sus diversas funciones destacan: la maduración del sistema digestivo, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. En el caso concreto de la *leucina aminopeptidasa*, se ha relacionado su nivel de actividad en la membrana de los enterocitos con el estado nutricional de los organismos en estadios iniciales. Las *carboxipeptidasas* son enzimas que liberan residuos aminoácidos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina

carboxipeptidasas (EC 3.4.16), que contienen un residuo de serina en su centro activo y las metalo carboxipeptidasas (EC 3.4.17), que requieren de iones Zn para ser activas.

Las amilasas.

Las *amilasas* catalizan la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno. Se dividen en alfa (α) y beta (β), o endo y exo amilasas. La α -amilasa (EC 3.2.1.1.) está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal, 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la β -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.*, 1994).

Las lipasas.

Este tipo de enzimas han sido clasificadas en dos tipos principales: 1) las esterasas (EC 3.1.1.1), que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tienen una cierta capacidad de solubilizarse y 2) las lipasas verdaderas que se distinguen porque hidrolizan sustratos poco solubles. Estas enzimas (EC 3.1.1.3) se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático). En organismos superiores, la lipasa pancreática actúa específicamente sobre los enlaces éster exteriores (enlaces α 1 y 3), por lo que se produce principalmente una mezcla de ácidos grasos y monoglicéridos. La hidrólisis digestiva de los triglicéridos es activada por el ion Ca^{2+} y requiere de la presencia de un factor llamado colipasa (Canioni *et al.*, 1977). La acción de la lipasa sobre su sustrato se ve enormemente favorecida por la existencia de la interfase agua-lípido, la cual es formada en el intestino gracias a la acción emulsionante de las sales

biliares o sus análogos. La colipasa actúa preservando la lipasa de la desnaturalización, y favoreciendo su adsorción al sustrato.

Las fosfatasas ácidas y alcalinas.

Las fosfatasas ácida y alcalina (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) catalizan la separación de fósforo inorgánico (P) a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), así como en procesos de transporte de nutrientes a través de membrana. De hecho, ambas fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos, e incluso de agua e iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Dupuis *et al.*, 1991).

1.3. Estudios de caracterización enzimática.

El estudio de las enzimas puede complementarse a través de la caracterización de diversos parámetros operacionales y la acción de sustancias específicas para comprender su modo de acción. Además estos conocimientos pueden ser muy útiles para la posible utilización de enzimas con características especiales en procesos industriales.

Los estudios de actividad enzimática se caracterizan por la estandarización de sus valores, por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica, los cuales se expresan en unidades internacionales (U), que representan la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto a 25°C.

La *actividad específica* se expresa en unidades por miligramo proteína, gramo de tejido fresco o por mililitro de preparado enzimático, que constituye una medida de pureza de la preparación enzimática. Por lo anterior, la actividad específica se calcula bajo

condiciones estándar, a una temperatura determinada (generalmente 25, 30 ó 37 °C) y en condiciones de sustrato saturantes.

Los estudios de caracterización de las distintas enzimas digestivas son esenciales si se quiere entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que representan. Para la caracterización, se pueden realizar diversos ensayos:

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima.

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el que su actividad es máxima y a este pH sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. De este modo, cada enzima presenta un determinado perfil de actividad con respecto al pH. Si las enzimas están por fuera del intervalo de pH fisiológico u óptimo, su estabilidad puede afectar su conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria sufriendo desnaturalizaciones irreversibles en soluciones muy ácidas o alcalinas (Ásgeirsson *et al.*, 1995).

Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima.

El punto óptimo aparente de temperatura es un parámetro operacional más que una característica fisiológica de la enzima, dado por el aumento de actividad con la temperatura ($Q_{10} \approx 2.0$), y por la posterior pérdida de la actividad de la enzima por desnaturalización térmica fuera de su intervalo de operación, ya que al absorber demasiada energía, los enlaces no covalentes que mantienen su estructura terciaria se rompen y la enzima se desnaturaliza. El verdadero óptimo, es aquel valor de temperatura al cual la enzima no solamente muestra una actividad alta, sino también una alta estabilidad a lo largo del tiempo.

Afinidad por sustratos específicos.

Se han obtenido un gran número de sustratos específicos, tanto naturales como sintéticos, que permiten establecer el tipo de catálisis que se produce en un extracto multienzimático. Las proteasas, tienen la capacidad de hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas, de manera que se puede determinar la especificidad por sustrato y las propiedades cinéticas. (Lehninger, 1984). Estos sustratos sintéticos están formados por un aminoácido, que varía según la enzima, unido a un grupo cromogénico simulando un enlace peptídico. Cuando la enzima hidroliza esta unión, aparece un compuesto que puede cuantificarse mediante métodos espectrofotométricos ó fluorométricos.

Caracterización mediante inhibidores específicos.

Los inhibidores son compuestos que disminuyen la tasa de hidrólisis de un sustrato dado. El uso de inhibidores específicos es una herramienta importante para la caracterización enzimática ya que éstos se unen a la enzima inactivándola, y disminuyendo la tasa de hidrólisis sobre un sustrato (Salvensen y Nagase, 1989).

En el caso específico de las proteasas, existen al menos dos grupos de inhibidores que varían en función de su mecanismo químico de catálisis: los que forman complejos covalentes entre el sitio activo de la enzima y el lugar de enlace con el sustrato (grupo serina y cisteína); y los que no lo hacen (ácidas y metal proteasas). Esta diferencia permite que las enzimas del primer grupo posean aminoácidos fuertemente nucleofílicos en su centro activo, por lo que, sus inhibidores deberán poseer grupos altamente nucleofílicos que incluyan dobles enlaces. Las otras proteasas realizan una catálisis más del tipo ácido/base sobre una molécula de agua,

de forma que la catálisis carece del carácter nucleofílico.

Los quelantes (EDTA y 1,10 fenantrolina) no se consideran en esta clasificación como inhibidores, sino más bien inactivadores ya que solo eliminan ciertos iones (Ca, Zn y Mg) que son esenciales para la activación de metal proteasas. Sin embargo, se utilizan con propósitos prácticos en la determinación del mecanismo de acción de las proteasas.

En la Tabla 2 se resumen los distintos tipos de inhibidores, así como especificidad y mecanismo de acción.

Utilización de técnicas electroforéticas.

Además de los estudios previamente explicados, la caracterización enzimática se puede complementar con técnicas electroforéticas específicas que se fundamenta en la aplicación de campos eléctricos a un gel, lo cual permite el movimiento de moléculas cargadas en solución. Las moléculas en el campo eléctrico se mueven a una velocidad determinada por su carga, forma y tamaño.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, incluida SDS-PAGE (electroforesis en presencia de duodecil sulfato sódico), es una herramienta bioquímica empleada en estudios de caracterización de proteínas (Laemmli, 1970) y detección de actividades enzimáticas (García-Carreño *et al.*, 1993), entre muchas otras funciones.

La electroforesis de macromoléculas, se realiza normalmente usando pequeñas cantidades de muestra en una solución estabilizada en una matriz porosa bajo la influencia de un voltaje determinado. Al final del corrimiento, las diferentes especies moleculares se observan como bandas en diferentes posiciones de la matriz (Andrews, 1995).

Tabla 2. Clasificación de inhibidores empleados en la caracterización de proteasas en función de su mecanismo de acción y peso molecular (modificado de García-Carreño, 1992).

Nombre	especificidad	modo de acción*	masa molecular (Dalton)
Bajo peso molecular			
<i>PMSF</i>	serina proteasas	1	174.2
<i>TLCK</i>	tripsina	1	332.5
<i>TPCK</i>	quimotripsina	1	351.5
<i>Iodoacetamida (IA)</i>	cisteina proteasa	1	184.9
<i>E-64</i>	cisteina proteasa	1	357.4
<i>Quimostatina</i>	serina proteasa	2	604.7
<i>Pepstatina A</i>	proteasas ácidas	2	685.9
<i>EDTA</i>	metal proteasas	2	372.2
<i>1,10 fenantrolina</i>	metal proteasas	2	198.2
Alto peso molecular			
<i>a2-antiplasmina</i>	serina proteasa	2	67000
<i>LBTI</i>	serina proteasa	2	9000
<i>SBTI</i>	serina proteasa	2	20100
<i>Cistatina</i>	cisteina proteasa	2	12000
<i>a2-macroglobulina</i>	proteasas	1	725000

PMSF = fenil-metil-sulfonil fluoruro; TLCK = tosyl-lisin-clorometil cetona; TPCK = tosil-fenilalanin-clorometil cetona; E-64 = trans-epoxisuccinil-l-leucilamido-(4-guanidino)butano; EDTA = ácido etilendiamintetraacético; LBTI = inhibidor trípico de la lima; SBTI = inhibidor trípico de la soya. * 1 indica inhibición irreversible; 2 inhibición reversible.

En el caso específico de la actividad proteolítica de un extracto se puede: 1) copolimerizar el sustrato (gelatina, caseína o fibrinógeno) en el gel antes de la electroforesis (Heussen y Dowdle, 1980), 2) incubar el gel de electroforesis con una película de rayos-X, así la gelatina se digiere en aquellas zonas donde existen enzimas con actividad proteasa (Cheung *et al.*, 1991; Paech *et al.*, 1993), y 3) incubar el gel en una solución de sustrato (Peyronel y Cantera, 1995). Adicionalmente se puede determinar mediante electroforesis el mecanismo de acción de las enzimas utilizando inhibidores específicos (García-Carreño *et al.*, 1993).

1.4. Estudios de digestibilidad *in vitro*.

Cuando se logra comprender la capacidad enzimática digestiva de los organismos, es posible aplicar estos conocimientos en aspectos relacionados a la nutrición animal. Una de las principales aplicaciones se da durante el cultivo de organismos a través de los

estudios de digestibilidad que permitan seleccionar ingredientes y mejorar las fórmulas para su alimentación.

El principal objetivo de la acuicultura comercial es maximizar el crecimiento y la supervivencia de los organismos, al mínimo costo y en el menor tiempo posible (Knights, 1985). Para ello es necesario satisfacer las necesidades fisiológicas y metabólicas mediante la optimización de dietas nutricionalmente adecuadas (Steffens, 1989). La alimentación suele representar entre el 30 y el 60% del costo total de producción (Tacon, 1993). En este sentido, el desarrollo de dietas comerciales capaces de satisfacer los requerimientos de una especie cultivada es considerado como uno de los principales objetivos de las investigaciones actuales (Hardy, 1989).

En la actualidad, son muchas las fuentes proteínicas que se utilizan para la elaboración de alimentos para la acuicultura; entre ellas destacan harinas y aceites de animales marinos, los

cuales sirven de base para la formulación y fabricación de los pellets. Sin embargo, la mayoría de esas fuentes de proteína no son valoradas desde el punto de vista de la capacidad digestiva de los organismos que las consumen. La formulación y fabricación de los alimentos se basan en los denominados análisis proximales, que cuantifican los nutrientes que contienen los alimentos, pero que no nos dan información sobre las cantidades de nutrientes requeridas por el organismo en un tiempo dado. Una aproximación que permite valorar la capacidad digestiva de los organismos es la utilización de métodos “*in vivo*”, en los que se determina una serie de parámetros o índices relacionados con el grado de aprovechamiento de las dietas, en relación con el nutriente que las compone. Todos estos ensayos resultan costosos, tediosos y largos debido a la necesidad de instalaciones adecuadas, mantenimiento de los animales y el análisis de éstos y sus excretas. Por otra parte, el empleo de marcadores no digeribles (como el óxido de cromo), para determinar la digestibilidad *in vivo*, conlleva algunos problemas y solamente nos da una medida indirecta de la digestibilidad, lo cual resulta complicado debido al lento crecimiento de las especies, la dificultad de recolectar las heces en el medio acuático y la influencia de los niveles de inclusión de éstos sobre el aprovechamiento de algunos combustibles (March *et al.*, 1985; Shiau y Liang, 1995).

Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos “*in vitro*” que simulan la digestión de los organismos y permiten predecir la digestibilidad de los diferentes ingredientes que son susceptibles de utilizarse en la formulación de dietas. De esta manera, algunos investigadores recomiendan que los estudios se encaminen hacia el desarrollo de este tipo de técnicas (Tacon, 1995). Los primeros estudios datan de más de 100 años estudiando la digestión con pepsina para predecir el valor nutritivo de

los diferentes componentes alimentarios, incluidas las proteínas (Wedermeyer, 1899). En los años 50 y 60's, se realizaban las digestiones con enzimas gástricas, proteasas microbianas o de mamíferos (Sheffner *et al.*, 1956; Ford y Salter, 1966).

A partir de ese momento, las técnicas se fueron sofisticando, hasta que se desarrollaron ensayos más rápidos y eficientes. Se elaboraron métodos solamente que investigaban la fase de digestión alcalina con preparados sintéticos de tres y cuatro enzimas (Hsu *et al.*, 1977; Satterlee *et al.*, 1979), donde se valoraba la digestibilidad por medio de la caída de pH en la solución proteica. A partir de los resultados obtenidos, se ha tratado de simular, en la medida de lo posible, el proceso de digestión completa, mediante sistemas con membranas permeables a modo de diálisis, que permiten separar y cuantificar en continuo los productos de hidrólisis (Savoie y Gauthier, 1986). Actualmente, se mejoraron los métodos anteriores con el desarrollo del sistema pH-stat que permite una determinación rápida de la digestibilidad de la proteína de las diferentes materias primas, las cuales varían en función de la cantidad y tipo de enzimas utilizadas, condiciones de hidrólisis, métodos de fraccionamiento digestivo y estudio de los productos resultantes. Este sistema fue desarrollado por Pedersen y Eggum (1983), el cual se basa en la medición del consumo de álcali necesario para mantener constante el pH que tiende a descender al romperse los enlaces peptídicos durante la hidrólisis o digestión.

El parámetro determinado es el grado de hidrólisis (GH en %) que relaciona los enlaces peptídicos hidrolizados por las proteasas digestivas con el número total de enlaces peptídicos presentes en una proteína (Adler-Nissen, 1976). Al número de estos enlaces hidrolizados en un proceso de hidrólisis se le denomina equivalentes de hidrólisis (h) y se expresa como mequiv/g proteína.

El valor de enlaces totales en una proteína se determina a través de su composición aminoacídica, como la suma de mmoles de aminoácidos por gramo de proteína.

La mayoría de los estudios se han aplicado a organismos terrestres por lo que la información en el ámbito de los organismos marinos es muy escasa como los estudios realizados en algunas especies de ciprínidos (Eid y Matty, 1989) y salmónidos (Grabner, 1985; Grabner y Hofer, 1985; Dimes y Haard, 1994). Sin embargo, actualmente existen una gran cantidad de investigadores que están aplicando esta clase de estudios con el objetivo de entender más a fondo la capacidad digestiva de las larvas de peces marinos y poder desarrollar dietas inertes en función de esa capacidad. Trabajos como el de Ehrlich *et al.* (1989), Verreth y Van Tongeren (1989), Holt (1993) Cahu y Zambonino-Infante (1994) y Moyano *et al.* (1998), por mencionar solamente algunos, han alentado el uso de dietas inertes para la sustitución parcial del alimento vivo durante el cultivo larvario, pues esto aminorará el costo de producción del cultivo y permitirá modificar las cantidades de nutrientes incluidos en las dietas de acuerdo a los requerimientos de cada especie (Cox y Pankhurst, 2000; Rønnestad *et al.*, 2001).

1.5. Uso de alimentos artificiales en larvicultura.

La piscicultura marina intensiva a escala mundial se caracteriza por la utilización de altas densidades de siembra en su proceso de producción y constituye una actividad relativamente reciente. Iniciada en los años 60's, en la actualidad se ha convertido en una industria totalmente rentable para especies de alto valor comercial, como salmones, jureles, lobinas, doradas, etc. Algunos de los casos más exitosos son España, Francia, Grecia, Japón, Canadá, Estados Unidos y Noruega, entre otros, que iniciaron sus estudios en los años

70's y que hasta el momento no solo no han alcanzado la saturación del mercado, sino que han incrementando sus producciones cada año (FAO, 2001). Lo anterior se ha logrado gracias al desarrollo de técnicas de cultivo que permiten la producción intensiva de larvas, y por lo tanto, el abastecimiento de semilla en niveles cada vez mayores, controlando todas las etapas el ciclo productivo, aumentando la cantidad y mejorando la calidad del producto (Tacon, 1993).

Las larvas de peces, especialmente los marinos, son los organismos más pequeños de los vertebrados. Poseen tasas de crecimiento muy altas y una progresiva diferenciación durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en los períodos juvenil y adulto (Blaxter, 1988). Sin embargo, el período larvario es uno de los más críticos donde se alcanzan mortalidades de más del 95 %, debido a una serie de factores como la naturaleza biológica de las larvas, tipos de sistemas utilizados, problemas genéticos, enfermedades y malnutrición, entre muchos. Para comprender y resolver esta problemática se deben realizar estudios específicos para cada uno de estos aspectos.

Las técnicas desarrolladas para la cría de larvas de peces marinos de ontogenia indirecta, implican la alimentación con presas vivas (alimentación exógena) durante los primeros 30 ó 40 días después de la eclosión (DDE), por lo que es preciso establecer a la par del cultivo larvario, cultivos anexos de fitoplancton y zooplancton para garantizar la alimentación de las larvas. Sin embargo, el costo en infraestructura, trabajo y energía representan un costo de inversión muy alto.

Desde un punto de vista nutricional, el alimento vivo no siempre es el más adecuado. Es común que el suministro de este tipo de alimento

pueda verse interrumpido por problemas en el cultivo, ocasionados por múltiples factores. Por ejemplo, la calidad nutritiva y precio de los nauplios de *Artemia* puede variar en función del lugar de origen de los quistes (Versichelle *et al.*, 1989), igualmente pueden ser vectores de ciertas enfermedades (parásitos, bacterias, virus, etc.).

Además, la producción del alimento vivo puede enfrentar dificultades como una provisión y calidad nutricional variables (Sorgeloos, 1980; Watanabe *et al.*, 1983). Consecuentemente, existe gran interés por desarrollar dietas inertes como una alternativa económica a la par de la producción de alimentos vivos. De esta forma, las dietas inertes ofrecen la oportunidad de introducir nutrientes que no están disponibles en el alimento vivo (Rosenlund *et al.*, 1997).

Las dietas inertes ofrecen una fácil disponibilidad, más bajos costos de producción y una mayor flexibilidad en las fórmulas, aunque deben cubrir una serie de características para poder ser usadas como alimento para larvas de peces marinos. Entre ellas destacan las siguientes (Alarcón, 1997; Tucker, 1998):

1. Balance nutritivo de la fórmula. Es fundamental conocer los requerimientos nutricionales de las larvas de distintas especies a la hora de diseñar una dieta artificial para sustituir el alimento vivo, por lo que para su formulación debe tenerse en cuenta la composición del zooplancton natural del que se alimentan en el ambiente. Sin embargo, hasta la fecha las metodologías que se emplean para conocer los requerimientos específicos de los estadios larvarios se basan en resultados de su composición corporal, crecimiento y mortalidad.

2. Homogeneidad de partículas. Que todas las partículas contengan la misma cantidad de nutrientes, para evitar que algunas larvas crezcan más rápido o estén mejor nutridas que otras.

3. Tamaño de las partículas. En función del tamaño de las larvas es necesario suministrar el alimento del tamaño adecuado, aproximadamente un 40% de la longitud de la boca.

4. Densidad de las partículas. El mantenimiento de las micropartículas en suspensión en los tanques de cría a densidades suficientemente altas y hundiéndose con suficiente lentitud, es necesario para permitir una fácil captura por parte de la larva.

5. Estabilidad en el agua. El diseño de las microdietas debe de evitar las pérdidas de nutrientes por lavado.

6. Solubilidad. Una vez en el interior del aparato digestivo deben de ser fácilmente solubilizadas para mejorar su digestibilidad.

7. Estabilidad en el envasado. Este punto es fundamental para que en el momento que la dieta sea utilizada, mantenga sus propiedades nutricionales durante largo tiempo hasta su utilización, evitando de esta manera la oxidación de los lípidos y otros compuestos esenciales.

8. Atractabilidad. No hay muchos estudios sobre el uso de atrayentes para aumentar la tasa de ingesta, sin embargo se sabe que un extracto de músculo de mejillón o una mezcla sintética de sustancias que lo imiten aumenta el apetito de peces jóvenes gracias a su alto contenido de aminoácidos libres y otros componentes químicos (Tandler *et al.*, 1982).

9. Palatabilidad. Se requiere que una vez que el alimento inerte se encuentre dentro de la boca del organismo, tenga la textura y propiedades adecuada para ser tragada.

10. Digestibilidad. La estructura y composición de la dieta debe permitir a la larva su digestión, ya que la existencia de un aparato digestivo poco desarrollado en los primeros estadios dificulta el aprovechamiento del alimento.

11. Contenido de agua. Actualmente, se recomienda el uso de microdietas con contenido de humedad

alto (> 20 %), ya que esto facilitará su tragado, digestión y absorción de nutrientes. Sin embargo, es difícil mantener la composición nutricional y la calidad del alimento conforme aumenta el contenido de humedad, por lo que se deberá encontrar un balance entre la cantidad de agua de la dieta y su calidad.

Es evidente que la mayoría de los factores son de naturaleza física y reflejan la importancia de adecuar el alimento a la morfología, fisiología y el medio físico de la larva (Tacon, 1995).

En la presente tesis el objetivo general consistió en estudiar los aspectos relacionados con la actividad y caracterización de enzimas digestiva durante la ontogenia inicial de la cabrilla arenosa. Así como, evaluar y seleccionar diversos ingredientes proteínicos a través de estudios de digestibilidad "*in vitro*" con los juveniles. Finalmente, se diseñaron tres dietas microparticuladas donde se sustituyó parcialmente la harina de pescado, y se realizó un experimento de destete en dos diferentes tiempos, para evaluar el efecto de dichas dietas durante la crianza de las larvas.

2. ANTECEDENTES.

A pesar de que en la actualidad existe una gran cantidad de trabajos sobre enzimología digestiva en peces, la mayoría se han realizado en adultos con el fin de: 1) caracterizar extractos crudos, enzimas semipurificadas y purificadas obtenidos de las diferentes secciones de su sistema digestivo (Chakrabarti *et al.*, 1995; Munilla-Morán y Saborido-Rey, 1996; Stoknes y Rustad, 1995; Alarcón *et al.*, 1998; Pérez-Borla *et al.*, 1998; Kestemont *et al.*, 1999; Tengjaroenkul *et al.*, 2000), y 2) intentar relacionar las capacidades digestivas de peces silvestres en función de sus hábitos alimenticios (Sarbah, 1951). De ese momento a la fecha, se ha continuado con los estudios en organismos adultos, los cuales han servido de base para desarrollar micrométodos en la detección, caracterización y purificación de enzimas digestivas de los peces.

La aplicación de estas técnicas bioquímicas en el cultivo y alimentación de larvas de peces fue desarrollado a la par de investigaciones del tipo causa-efecto, donde se ofrecía a las larvas algún tipo de alimento y se observó únicamente la respuesta sobre el crecimiento y la supervivencia. De cualquier forma, muchos de los estudios de caja negra han servido de sustento para la realización de estudios más finos. Algunas de estas investigaciones fueron realizadas inicialmente en larvas de la carpa común *Cyprinus carpio*, rodaballo *Scophthalmus maximus*, coregono *Coregonus lavaretus* y *C. peled*, cabrilla *Micropterus dolomieu*, brema roja *Pagrus major* y lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*, bagre africano *Clarias gariepinus*, lubina *Dicentrarchus labrax* y dorada *Sparus aurata*, sustituyendo parcialmente el uso de presas vivas (principalmente *Artemia*). Los resultados de estos estudios fueron muy variables, obteniendo desde 30 hasta más del 85 % de supervivencia dependiendo del tipo de ontogenia de la

especie. Estos estudios sentaron las bases que permitieron comenzar con la aplicación de herramientas bioquímicas para mejorar la supervivencia y el crecimiento durante la crianza larvaria (Bryant y Matty, 1981; Person-Le Ruyet *et al.*, 1983; Dabrowski *et al.*, 1986; Ehrlich *et al.*, 1989; Kanazawa *et al.*, 1989; Verreth y Van Tongeren, 1989; Barnabé y Guissi, 1994; Fernández-Díaz *et al.*, 1994).

Así, muchos autores se han dado a la tarea de estudiar la presencia de enzimas digestivas en larvas de peces, sin embargo, las primeras investigaciones se realizaron de forma puntual y no en relación a los cambios morfofisiológicos, ni de la dieta; por lo que solamente se advirtió la presencia de varios tipos de enzimas en muchas larvas de peces de agua dulce y marinos (Tabla 3).

Asimismo, se han estudiado los cambios en la actividad de enzimas relacionándolos con los cambios morfológicos y el tipo de alimento proporcionado. De esta manera, Tanaka *et al.* (1972) detectaron un incremento en la actividad amilasa y pepsina, las cuales coinciden con la aparición de las glándulas gástricas a los 25 mm de longitud en alevines de *Plecoglossus altivelis*. Alliot *et al.* (1977), determinaron una baja actividad de esterasas, α -glucosidasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, fosfatasa ácida y alcalina al momento de la eclosión en larvas de *Dicentrarchus labrax*. Asimismo, Hofer y Uddin (1985), encontraron que la actividad tripsina del intestino se incrementó con la edad durante el desarrollo de las larvas del rutilo *Rutilus rutilus*, lo cual se correlacionó con el incremento del intestino de 44 a 104 % del total de la longitud y con las tasas del paso del alimento por el intestino, las cuales variaron de 2.5 h en larvas a 6.2 h en adultos. Buddington (1985), probaron que durante los primeros 16 DDE el sistema digestivo no estaba diferenciado y que la secreción de enzimas digestivas

era muy baja, mientras que la secreción de enzimas ácidas se observó entre los días 14 y 18 DE; además, que las actividades tipo lipasa y amilasa fueron altas en el período larvario y disminuyeron al desarrollarse completamente el sistema digestivo en

larvas del esturión de lago *Acipenser fulvescens*. Luczynski *et al.* (1987), determinaron la alta actividad proteolítica de corionasa al momento de la eclosión y su posterior disminución al momento de la eclosión.

Tabla 3. Actividades enzimáticas digestivas reportadas para larvas de peces. Signo positivo (+) indica presencia, signo negativo (-) indica ausencia y (NE) indica no ensayado.

Especie	Tiempo total (días)	Pepsina	Tripsina	Quimotripsina	Amino-peptidasa	Lipasa	Amilasa	Maltasa	Autor
<i>Onchorhynchus mykiss</i>	2-110	NE	+	+	+	NE	NE	NE	Lauff y Hoffer, 1984
<i>O. mykiss</i>	2-66	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	Dabrowski, 1982
<i>O. mykiss</i>	0-60	+	+	NE	NE	NE	+	+	Kawai e Ikeda, 1973a
Híbridos de <i>Coregonus</i>	2-130	NE	+	+	+	NE	NE	NE	Lauff y Hoffer, 1984
<i>Coregonus pollan</i>	2-42	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	Dabrowski, 1982
<i>Plecoglossus altivelis</i>	2-30	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	Tanaka <i>et al.</i> , 1972
<i>Exos lucius</i>	18 d	+	+	NE	NE	-	-	NE	Szlaminska, 1980
<i>Cyprinus carpio</i>	0-125	+	+	NE	NE	NE	+	+	Kawai e Ikeda, 1973b
<i>Gadus morhua</i>	0-30	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	Hjelmeland <i>et al.</i> , 1983
<i>Acanthopagrus shlegelii</i>	0-35	+	+	NE	NE	NE	+	NE	Kawai e Ikeda, 1973b
<i>Dicentrarchus labrax</i>	0-30	+	+	+	NE	NE	NE	NE	Alliot <i>et al.</i> , 1977

Ueberchär (1993), observó la aparición y el incremento de la actividad tripsina y pepsina (formación del estómago) en larvas de *Scophthalmus maximus* y *Clupea harengus*, por lo que fueron tomadas como un indicador de la maduración del sistema digestivo. Walford y Lam (1993) detectaron exclusivamente actividad proteolítica alcalina durante los primeros días de vida, y hasta el día 22 DE. Mientras que la aparición de enzimas proteolíticas ácidas se detectó posteriormente en larvas del barramundi *Lates calcarifer*, además, mencionan la posible contribución de los alimentos vivos en la activación de estas enzimas. Lauff y Hofer (1984), concluyeron que el uso de alimentos vivos incrementa la actividad tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa de tres especies de peces que presentan ontogenia directa, *Coregonus sp.*, *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) y

Rutilus rutilus, por lo que es complicada la sustitución por alimento artificial. Kolkovski *et al* (1993), detectaron el incremento de enzimas intestinales, influenciadas por el alimento exógeno con larvas de la dorada *Sparus aurata*. Oozeki y Bailey (1995) encontraron que en larvas del abadejo de Alaska *Theragra chalcogramma* las actividades tripsina y lipasa se mantuvieron bajas durante el período de transición del alimento endógeno al exógeno, que la actividad amilasa se mantuvo constante, y que al final del período larvario estas tres enzimas incrementaron su actividad. Estos autores sugieren la existencia de dos tipos de lipasa, la primera que muestra un pico de actividad en el día 4 DE y se relaciona con la absorción del vitelo, y el segundo que se incrementa en el día 14 DE, y se relaciona con la digestión de los lípidos de las presas.

Kuz'mina (1996) encontró fluctuaciones en las actividades de proteasa alcalina, amilasas, sucrasa y fosfatasa alcalina en el pez pico *Exos lucius*, la perca, *Perca fluviatilis*, la brema, *Abramis brama* y el rutilo *Rutilus rutilus* durante su crecimiento, y las relaciona con los cambios en las preferencias alimenticias de estos peces. En el caso de la perca, detectó la caída de las actividades amilasa y sucrasa, pero un incremento de la actividad proteasa alcalina, por lo cual concluyó que esta especie es de hábitos bentófagos facultativos a diferencia de la brema y el rutilo, las cuales fueron consideradas especies bentófagos estrictas.

Martínez *et al.* (1997), encontraron que la mayor actividad de enzimas digestivas perteneció a la proteasas, amilasas y lipasas, así como las fosfatasas ácida y alcalina, y observaron que las variaciones en las actividades de las enzimas estuvieron relacionadas al inicio y final de la metamorfosis; la proteasa ácida participó con el 10 % del total de la actividad para el día 9 DE, pero excedió el 75 % para el día 33 DE. Así también, la máxima actividad lipasa se relacionó con el desarrollo del páncreas exócrino (entre el día 6 y 10 DE). La actividad de fosfatasas alcalinas decreció del día 5 al 20 DE, para después incrementarse rápidamente, lo que posiblemente está relacionado con la maduración de los enterocitos en larvas de *Solea senegalensis*.

Baglolle *et al* (1998), encontraron en larvas del lenguado de invierno (*Pleuronectes americanus*) y del lenguado de cola amarilla (*Pleuronectes ferrugineus*), diferencias entre las alimentadas con presas vivas y dieta inerte a partir del día 15 DE, y en larvas en inanición. La fosfatasa alcalina, dipeptidil peptidasa IV, aminopeptidasa M y esterases estuvieron presentes a partir del día 3 DE, estando diferencialmente distribuidas, lo cual

coincide con el desarrollo morfológico. En las larvas de ambas especies alimentadas con presas vivas, la actividad de estas enzimas estuvo presente en el intestino, y solamente en el recto de las larvas del lenguado de cola amarilla. La fosfatasa alcalina se presentó en la sección post esofágica (presuntamente el estómago) en el lenguado de invierno. En las larvas del lenguado de invierno en inanición no se detectó ninguna de las actividades enzimáticas, mientras que en el lenguado de cola amarilla las actividades aminopeptidasa M y esterasa sí fueron detectadas. La actividad fosfatasa ácida no fue detectada en ninguna especie.

Zambonino-Infante y Cahu (2001), resaltan la importancia de los cambios morfológicos y celulares durante la ontogenia del tracto gastrointestinal y el desarrollo de la larva, los cuales a su vez activan cambios genéticamente programados. Mencionan que durante los estadios tempranos, las larvas de peces marinos muestran ciertas particularidades en relación a la formación del páncreas exócrino, donde la expresión de la amilasa decae con la edad; mientras que la expresión de tripsina, lipasa y fosfolipasa A2 se incrementa progresivamente hasta el final del período larvario. Además, las funciones secretorias del páncreas exócrino se incrementan durante el desarrollo siendo más eficientes antes de la tercera semana de vida. En relación al intestino, las enzimas del citoplasma de los enterocitos, en particular la peptidasa, presentan una alta actividad en larvas jóvenes. Aproximadamente a la cuarta semana de desarrollo, las actividades citosólicas decaen y se observa un fuerte incremento en las enzimas de la membrana del borde de cepillo, como son la fosfatasa alcalina, la aminopeptidasa N y la maltasa. Este proceso es el que caracteriza la maduración normal de los enterocitos durante el desarrollo de las larvas y de otros vertebrados, por lo que el

establecimiento de una digestión eficiente en la membrana del borde de cepillo en las larvas, representa el modo de digestión de los peces adultos, el cual, dependiendo de la composición de la dieta podrá incrementarse, detenerse o reducirse.

Por otra parte, la investigación de Gawlicka *et al.* (2000), con larvas de *Hippoglossus hippoglossus*, en el cual detectan el incremento de tripsina, lipasa, amilasa y fosfatasa alcalina en diferentes días hasta antes de la metamorfosis y resaltan la capacidad digestiva de esta especie, aunque su mayor capacidad se da después de la metamorfosis. García-Ortega *et al.* (2000) monitorearon la actividad de proteasas alcalinas y tripsina en el intestino de larvas de *Clarias gariepinus* en inanición, después de una alimentación, y por medio de la alimentación continua. Estos autores encontraron que en las larvas en inanición, la actividad fue muy baja y se mantuvo sin cambios, además que no detectaron un aporte significativo de las enzimas exógenas, por lo que la secreción de proteasa alcalinas fue considerada basal. Por otra parte, para las larvas alimentadas en una sola ocasión, la actividad enzimática se incrementó después de tres horas, llegando a su máximo a las 12 h postalimentación. En las larvas que se alimentaron continuamente, la actividad total de proteasas cambió manteniéndose en un nivel constante después de las alimentaciones y llegando a un nivel intermedio entre la basal y la de la única alimentación. No encontraron ciclos rítmicos en la producción de enzimas proteolíticas durante un período de 24 h. Para la actividad tipo tripsina, se detectó un patrón similar que en las proteasas alcalinas totales. La contribución de enzimas digestivas por parte de la *Artemia* a la digestión total de las larvas de este pez fue calculada en menos del 1 %.

Asimismo, Fernández-Díaz *et al.* (2001), demostraron que las tasas de crecimiento mejoraron en relación al régimen de alimentación utilizado antes del período de premetamorfosis y concordando con la disminución de las reservas del cuerpo y la aparición de algunas enzimas digestivas en larvas del lenguado sol *Solea senegalensis*. Tengjaroenkul (2002), detectó la mayor concentración de enzimas en la pared de borde de cepillo de los enterocitos en el intestino y en el citoplasma de los enterocitos, por lo que este autor concluye que desde la eclosión las larvas tienen una buena capacidad enzimática para hidrolizar los diversos tipos de nutrientes (endógenos y exógenos). Chong *et al.* (2002) demostraron en las larvas del pez disco *Symphysodon aequifasciatus*, la presencia de proteasas alcalinas tipo tripsina, misma que incrementa su actividad a partir del día 3 DE. Estos autores relacionan estos cambios con la formación del estómago que ocurre en el día 10 DE. A partir de estos datos concluyen que es posible realizar la sustitución del alimento vivo en el día 25 DE.

Cuvier-Péres y Kestemont (2002), encontraron en larvas de la perca *Perca fluviatilis*, que el desarrollo de enzimas pancreáticas fue similar al de otras especies de peces, siendo detectadas desde la eclosión. Las actividades tripsina y amilasa se incrementaron durante los primeros días de desarrollo, para después decaer y mantenerse constantes conforme la larva creció. El incremento de la actividad quimotripsina fue proporcional al crecimiento de las larvas. Después del día 21 DE y hasta el final del experimento, se detectó un fuerte incremento en las actividades de fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa N, maltasa y γ -glutamyl transpeptidasa, las cuales reflejaron la maduración del borde de cepillo de los enterocitos, además que se observó la caída de la actividad de la leucina-

alanina peptidasa, que es una enzima del citoplasma.

Cara *et al.* (2002) con el sargo *Diplodus sargus*, observaron la aparición temprana de todas las actividades, particularmente las proteasas. Las variaciones detectadas en la actividad se relacionaron fundamentalmente con los cambios en la alimentación a lo largo del desarrollo larvario. De los resultados obtenidos se deduce, que hay tanto un desarrollo precoz de la función digestiva, como una significativa capacidad de supervivencia tras la adaptación al alimento inerte, lo que apunta a la posibilidad de criar las larvas de esta especie empleando únicamente alimentos artificiales. En larvas leptocéfalas de la anguila japonesa *Anguilla japonica*, se observó que la principal proteasa es la tripsina, la cual se incrementa con la edad de la larva hasta el día 16 DE, para después decaer y mantenerse constante hasta el final de la crianza (Pedersen *et al.*, 2003). Al adicionar el alimento, se observó también que la actividad de esta enzima se incrementó, aunque en mayores niveles al utilizar una dieta inerte. Este aumento es atribuido a la retención de tripsina secretada de una ingesta de alimento previa. También determinaron que el tiempo de retención de la tripsina en el tracto digestivo de estas larvas es de al menos 15 h, mientras que el paso del alimento tarda entre 1 y 5.5 h, dependiendo si es alimento vivo o dieta inerte.

Otros estudios dan un enfoque ligeramente fisiológico tratando de entender el proceso de alimentación por medio de la utilización de sustancias atrayentes (aminoácidos libres, ácidos grasos y enzimas digestivas) y procesos de coalimentación, como el de Kolkovski *et al.* (1997a), donde se encontró que la coalimentación de larvas de *Dicentrarchus labrax* con dietas microparticuladas a las que se les incluyó enzimas pancreáticas exógenas incrementan la ingesta, promueven la

asimilación y deposición de nutrientes dietarios en el cuerpo de las larvas. Kolkovski *et al.* (1997b y c) demostraron que la estimulación visual y química juegan un papel relevante, de forma sinérgica, para lograr la alimentación y destete temprano adicionando una mezcla de alimento vivo y dieta artificial en larvas de *Sparus aurata*. Escaffre *et al.* (1997), estudiaron la posibilidad de incluir un concentrado proteínico de soya en dietas prácticas para larvas de carpa *Cyprinus carpio*, así como el efecto del inhibidores de este ingrediente como el inhibidor de soya tipo 1 (SBT1) en dietas purificadas. Estos autores concluyen que utilizando inclusiones de 40 % del concentrado proteínico de soya en la dieta no se afectaron las actividades tripsina y amilasa en las larvas, además de que no fueron detectados efectos sobre el crecimiento ni en la supervivencia por debajo de estas inclusiones. Un efecto similar fue encontrado en larvas del lenguado *Hippoglossus hippoglossus*, lenguado sol *Solea senegalensis*, rodaballo *Scophthalmus maximus* y dorada *Sparus aurata*, donde la coalimentación y adición de estas sustancias en la dieta inerte incrementaron la supervivencia de las larvas (Rosenlund *et al.*, 1997; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dhert *et al.*, 1999; Kolkovski y Tandler, 2000).

La revisión de Kolkovski (2001), se resaltan los cambios en el tracto digestivo en función de la edad durante la transformación de larva a juvenil en relación al tipo de dieta, características bioquímicas y la utilización de nutrientes. En las larvas de peces, la tasa de hidrólisis y transporte de nutrientes en el intestino dependen del tipo y cantidad de enzimas genéticamente programadas, y responden al tipo de dieta que consumen en el ambiente. Teniendo esto en mente, es posible elaborar dietas artificiales que puedan satisfacer todas las necesidades de las larvas. En la primera alimentación, el tracto digestivo de la mayoría de las especies de peces contiene enzimas

relacionadas al metabolismo de la digestión y absorción de moléculas como proteínas, lípidos y glucógeno. La actividad de las enzimas en las larvas es baja comparada con la de los adultos. Cada enzima se desarrolla independientemente durante la ontogénesis, con variaciones dependientes de la especie y temperatura. Se ha sugerido que el alimento vivo consumido por la larva, asiste a la digestión donando sus propios neuropéptidos, factores de crecimiento y enzimas digestivas, ya sea por autohidrólisis o cuando los zimógenos del alimento se activan en el tracto de la larva. Estas sustancias son frecuentemente omitidas en las dietas inertes, particularmente en dietas para larvas que contengan proteínas e ingredientes difíciles de digerir, además del bajo contenido de humedad (30-10 %) comparados con los alimentos vivos que contienen más del 90 %. La inclusión de diferentes enzimas digestivas, especialmente proteasas, en las dietas para las larvas, pueden resultar en mejorías significativas de la utilización de nutrientes. Sin embargo, los intentos realizados hasta ahora, no han alcanzado los resultados que se obtienen con el alimento vivo. El siguiente paso, la inclusión de proteínas prehidrolizadas en las dietas, ha dado resultados variables dependiendo del porcentaje de inclusión del hidrolizado y la edad de la larva, se ha estudiado también el efecto de la inclusión de neuropéptidos, como la bombasina, en la formulación de dietas, y se ha demostrado que incrementan la ingesta de la dieta y mejoran el crecimiento de las larvas (Kolkoski, 2001).

El grupo de nutrición del Instituto Francés sobre la Explotación del Mar (IFREMER) realizó una serie de estudios sobre la aparición de la maquinaria enzimática (tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina, leucina peptidasa, leucina aminopeptidasa y γ glutamil transpeptidasa) en larvas de

Dicentrarchus labrax con miras a evaluar, por un lado, si era posible realizar la sustitución del alimento vivo por alimento artificial, incrementando la supervivencia y el crecimiento; y por el otro, desarrollar una dieta microparticulada adecuada que permitiera lograr la maduración temprana de las células intestinales. Como resultado de esta serie de investigaciones, se logró encontrar una dieta basada en ingredientes de origen marino, que mejoró la supervivencia en el período larvario hasta en un 65 % (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Zambonino-Infante y Cahu, 1994a y b; Cahu, 1996; Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Cahu y Zambonino-Infante, 1997). Otra investigación de Cahu *et al.* (1998) en el cual hacen una comparación entre la capacidad digestiva de las larvas de la carpa común *Cyprinus carpio* (pez omnívoro) y las larvas de la lubina *Dicentrarchus labrax* (pez carnívoro) a partir de la utilización de dietas artificiales con diferentes proporciones de hidrolizados de pescado, y levadura, además de los datos previamente obtenidos acerca de la aparición de la maquinaria enzimática presente en ambas especies, concluyendo que la utilización de dietas basadas en hidrolizados y levadura incrementan la supervivencia de las larvas (hasta el 35 % para *Dicentrarchus labrax* y hasta el 98 % para *Cyprinus carpio*), comparados con la dieta basada exclusivamente en harina de pescado.

Recientemente, se han realizado nuevas investigaciones que resaltan la necesidad de utilizar hidrolizados de organismos marinos y levaduras, como fuentes proteicas, en las dietas para las larvas de *Dicentrarchus labrax*, además de la necesidad de incrementar la cantidad de lípidos en la dieta (>20 %) para lograr la maduración de las células del tracto digestivo de la larva a fin de incrementar la supervivencia y el crecimiento (Cahu *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 1999).

Además, este grupo de investigadores están realizando estudios con especies de importancia comercial como el lenguado sol *Solea senegalensis* en otros países a fin de mejorar las condiciones del larvicultivo a partir del conocimiento de la maquinaria enzimática (Ribeiro *et al.*, 1999).

En España, otro grupo de investigadores estudió la aparición, actividad y caracterización de enzimas digestivas de larvas de *Sparus aurata* y *Dentex dentex* con el fin de lograr la sustitución parcial o total del uso de alimento vivo en el cultivo; además de la aplicación de estudios "*in vitro*" para probar la digestibilidad de las enzimas digestivas sobre diferentes fuentes proteínicas y elaborar dietas inertes (Alarcón, 1995; Moyano *et al.*, 1996; Alarcón, 1997; Díaz *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Alarcón *et al.*, 1998; Alarcón y Martínez, 1998; Alarcón *et al.*, 1999a y b; Alarcón *et al.*, 2001). Todos estos estudios han logrado desarrollar microdietas que han permitido incrementar la supervivencia de estas especies por arriba del 60 %.

En México, son escasos los estudios realizados sobre este tema en larvas de peces, donde cabe resaltar el estudio realizado por Aguilera-González (1999) con larvas de *Atractosteus spatula*, que es un pez de agua dulce que presenta ontogenia directa. En este estudio se observó que las enzimas digestivas (proteasas alcalinas, proteasas ácidas, amilasa, esterasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina) están totalmente activadas desde la eclosión, y por ende, la sustitución total del alimento vivo (*Artemia*) por alimento artificial es posible sin que se vea un efecto en la supervivencia y el crecimiento.

Por otra parte, existen algunos trabajos relacionados al cultivo de la cabrilla arenera, como son los desarrollados por Cadena-Roa y Roldán-Libenson (1994) y Avilés-Quevedo *et al.* (1995) donde se destaca la posibilidad del cultivo comercial de esta especie.

Desde hace algunos años el CICIMAR-IPN, ha desarrollado de manera importante el cultivo de la cabrilla arenera, abarcando desde la reproducción en cautiverio (Rosales-Velázquez, 1997), la producción de semilla bajo condiciones controladas (Alvarez-González *et al.*, 2001a), la engorda en jaulas flotantes (Grayeb-Del Alamo *et al.*, 1998), la producción de alimento vivo (Rueda-Jasso, 1993; Payán-Aguirre, 1994; Osorio-Galindo, 1998), algunas de las enfermedades que atacan a esta especie (Martínez-Díaz, 1995). En el ámbito de la nutrición de esta especie, se han realizado algunos estudios sobre todo con juveniles donde se han determinado los requerimientos de proteína-energía y lípidos con dietas inertes (Anguas-Vélez *et al.*, 2001a; Alvarez-González *et al.*, 2001b; Civera-Cerecedo *et al.*, 2002). Además, se realizó el primer intento para sustituir el alimento vivo por dietas inertes en la alimentación de las larvas, donde se menciona que el tiempo más adecuado es después de los 30 días después de la eclosión (Anguas-Vélez *et al.*, 2000b). Aún así, existen incógnitas que requieren de un estudio minucioso si se pretende incrementar y mejorar la producción. En este último aspecto, se ha comenzado con los estudios básicos relacionados con el desarrollo del sistema digestivo durante la crianza de la cabrilla arenera (Peña-Martínez *et al.*, 2003), por lo que el cultivo intensivo de la cabrilla arenera se ve como una posibilidad cada vez más real en años venideros.

3. JUSTIFICACIÓN.

México es un país con gran potencial para la acuicultura, especialmente en el ámbito de la piscicultura marina. Sin embargo, su desarrollo se ha visto limitado por diversos factores, entre los cuales destacan la carencia de estudios respecto a las especies de peces con potencial acuícola, y en especial las investigaciones encaminadas para desarrollar la producción intensiva de semilla por medio del cultivo masivo de larvas. Si consideramos esta problemática, es necesario abordar estos aspectos, y por consecuencia, profundizar en los trabajos sobre la nutrición de estas especies. En la medida que se mejore el proceso de alimentación durante la crianza de las larvas, ya sea a través del uso de alimentos vivos o dietas microparticuladas de alta calidad, la producción de juveniles será posible, disminuyendo las altas mortalidades y aumentando la tasa de crecimiento de los peces.

De esta manera, conforme la calidad y cantidad de la semilla de peces marinos vaya mejorando, por medio de

estudios de nutrición aplicados, la baja afluencia de inversionistas interesados en este tipo de proyectos, que han sido denominados de alto riesgo, irá aumentando paulatinamente.

Actualmente el CICIMAR-IPN, cuenta con la tecnología básica y la infraestructura necesarias para realizar los estudios de nutrición para la producción de semilla de la cabrilla arenosa, por medio de la utilización de sistemas de circulación cerrada, los cuales son relativamente nuevos en México. En este aspecto, los sistemas con que se cuenta han sido evaluados para la producción intensiva de larvas y juveniles. Sin embargo, si se quiere incrementar el número de juveniles cosechados y mejorar la calidad de la semilla durante el cultivo intensivo, es necesario conocer lo referente a la capacidad digestiva de las larvas, lo cual permitirá que la producción aumente, al lograr la sustitución parcial del alimento vivo por dietas microparticuladas que tengan la calidad adecuada en función de la maquinaria enzimática digestiva presente en las larvas y por ende, mejorar la supervivencia, incrementar el crecimiento y la resistencia de los peces al manejo.

4. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la capacidad digestiva a través de técnicas bioquímicas en larvas y juveniles de la cabrilla arenosa que permitan diseñar dietas inertes para la alimentación y destete temprano durante el larvicultivo.

5. ONTOGENIA DE ENZIMAS DIGESTIVAS EN LARVAS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS EN JUVENILES DE LA CABRILLA ARENERA.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar la actividad de diversas enzimas digestivas, involucradas durante la ontogenia inicial de la cabrilla arenera, alimentadas con presas vivas (rotífero y nauplios de *Artemia*).

Realizar la caracterización enzimática a través de análisis electroforéticos sobre las proteasas, lipasas y amilasas presentes en los extractos multienzimáticos de las larvas de la cabrilla arenera.

Determinar el efecto de diversas condiciones ambientales (pH y temperatura) e inhibidores por medio de pruebas específicas sobre los extractos multienzimáticos de juveniles de la cabrilla arenera.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.2.1. Obtención de huevos y crianza larvaria.

Los huevos se obtuvieron por medio de un desove espontáneo de reproductores mantenidos bajo condiciones controladas (Rosales-Velázquez, 1997) en el Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN. Se contabilizó un total de 162,800 huevos que fueron colocados en una incubadora cilíndrica de fibra de vidrio de 100 l de capacidad, calculándose una densidad inicial de 1,628 huevos/l. Las condiciones de eclosión fueron 31 ‰ de salinidad y 24 °C de temperatura, con aireación y recambio de agua constante durante 12

h hasta su eclosión. Se calculó una tasa de eclosión del 94 %, estimando una cantidad total final de 153,032 eleuteroembriones. Estos fueron sembrados volumétricamente en el sistema cerrado (SC-12) de la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) del CICIMAR-IPN en tres de los tanques del sistema (Fig. 2), agregando un total de 4.5 l por tanque (6,000 larvas por tanque), para ajustar a una densidad inicial de 48 ± 3 ind/l (media $\pm$ desv. std.). En función de lo propuesto por Alvarez-González et al (2001a) se aplicó la estrategia de crianza ajustando la alimentación para esta densidad inicial.



Figura 2. Sistema cerrado para la crianza de larvas de la cabrilla arenera.

Se realizó el seguimiento diario de los siguientes parámetros ambientales: la salinidad (35.8 ± 1.1 ‰), la temperatura (23.1 ± 1.1 °C) y el oxígeno disuelto (6.4 ± 0.3 mg/l), mismas que fueron medidas por medio de un oxímetro de campo marca YSI modelo 85 (Yellow Springs, Ohio, USA). El pH (8.1 ± 0.1) fue monitoreado utilizando un potenciómetro (ORION 410A, Orion Research Inc., USA). Finalmente, el amonio total (0.1 ± 0.1 ppm) y el nitrito total (0.02 ± 0.01 ppm) se cuantificó por

medio de técnicas colorimétricas (Strickland y Parsons, 1967).

La alimentación exógena se inició a partir del segundo día, en el momento que las larvas concluyeron la absorción del saco vitelino, pigmentaron los ojos y ocurrió la apertura de la boca y del ano. Los alimentos suministrados (Tabla 4) fueron el rotífero *Brachionus plicatilis*, y nauplios y juveniles de *Artemia franciscana* (Microfeast Artemia Cyst, Burns Philp Foods Inc., Oklahoma, USA).

Tabla 4. Tabla de alimentación para la cría de larvas de cabrilla arenera a una densidad inicial de 48 ± 3 larvas/l.

DIA	Rotíferos <i>Brachionus plicatilis</i> (org/ml)	<i>Artemia</i> sp. (org/ml)	Microalga <i>Nannochloris</i> sp. (cel/ml)
1	-	-	3×10^5
2	2.1 S	-	-
3	0.7 S	-	3×10^5
4	2.3 S	-	-
5	4.2 E	-	6×10^5
6	7.7 E	-	-
7	7.3 E	-	6×10^5
8	9.2 E	-	-
9	11.6 E	-	-
10	8.3 E	-	-
11	8.3 E	-	-
12	10.1 E	-	-
13	7.1 E	1 n S	-
14	6.5 E	2.1 n S	-
15	5.8 E	2.1 n E	-
16	-	3.3 n E	-
17	-	4.1 n E	-
18	-	4.9 n E	-
19	-	4.9 n E	-
20	-	8 n E	0.09 j
21	-	8 n E	0.13 j
22	-	8 n E	0.08 j
23	-	8 n E	0.11 j
24	-	12 n E	0.23 j
25	-	12 n E	0.23 j
26	-	12 n E	0.05 j
27	-	12 n E	0.12 j
28	-	12 n E	0.10 j
29	-	8 n E	0.14 j
30	-	4 n E	0.15 j

E: enriquecido, S: sin enriquecer, n: nauplio, j: juveniles.

El enriquecedor que se utilizó fue el Super HUFA enrich (Salt Creek, Salt Lake City, Utah, USA) en las cantidades recomendadas por el productor (0.1 g de enriquecedor por cada 1'000,000 de rotíferos por litro durante 6 horas a 25 °C y 0.1 g de enriquecedor por litro para cada 300,000 metanauplios de *Artemia* a 25 °C durante 24 h).

Se realizó el siguiente calendario de muestreo: de la incubadora se

tomaron larvas que permanecieron en inanición durante 4 días, desde huevos (denotados como tiempo 0), 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la eclosión (HDE) por triplicado. En el caso de las larvas alimentadas, las muestras se tomaron los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 25 y 30 después de la eclosión (DDE), antes de la primera alimentación al día (8:00 AM) por cada tanque sembrado. La cantidad de organismos muestreados para la determinación de la actividad

enzimática se realizó de la siguiente manera; de organismos en inanición se tomaron: 800, 1200 y 1480 huevos (0 HDE); 200, 282 y 340 eleuteroembriones (12 HDE); 203, 279 y 521 eleuteroembriones (24 HDE); 200, 224 y 254 larvas (48 HDE); 225, 232 y 377 larvas (72 HDE); y 218, 221 y 223 larvas (96 HDE) por tanque. De las larvas alimentadas se tomaron: 143, 202 y 254 larvas (2 DDE); 155, 169 y 252 larvas (3 DDE); 159, 196 y 221 larvas (4 DDE); 141, 150 y 152 larvas (5 DDE); 87, 91 y 143 larvas (7 DDE); 89, 112 y 134 larvas (9 DDE); 55, 60 y 90 larvas (12 DDE); 64, 65 y 67 larvas (15 DDE); 48, 53 y 55 larvas (18 DDE); 27, 42 y 50 larvas (25 DDE); y 15 larvas (30 DDE) por cada tanque. Además se recolectaron muestras de rotíferos sin enriquecer y enriquecidos, nauplios sin enriquecer y enriquecidos, y juveniles de Artemia. Todas las muestras fueron enjuagadas con agua destilada, congeladas, liofilizadas y preservadas a -50°C hasta su posterior análisis.

5.2.2. Preparación de las muestras.

Los extractos enzimáticos fueron obtenidos por medio de la maceración de las muestras de huevos, eleuteroembriones, larvas en inanición, alimentadas y alimentos vivos en 2 a 4 volúmenes de buffer tris-HCl 50 mM, 20 mM de CaCl_2 a un pH de 7.5. Los extractos se centrifugaron a 14,000 rpm

por 30 minutos a 5°C , recuperando el sobrenadante y almacenándolo en alícuotas de 1 ml a -20°C hasta su utilización.

5.2.3. Determinación de la proteína soluble.

Para la determinación de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de análisis Bradford (Bradford, 1976). A 5 μl de extracto problema se le añadió 1 ml de reactivo de Bradford y se agitó en vortex. La densidad óptica (DO) se midió a 595 nm en un espectrofotómetro uv/visible entre los 15 y 60 minutos del comienzo de la reacción colorimétrica. Todas las medidas se realizaron por triplicado. La recta patrón se llevó a cabo con una solución estándar de albúmina bovina (1 mg/ml).

Dado que la sensibilidad de este método está comprendida entre 0 y 25 $\mu\text{g/ml}$, aquellos extractos que daban una $\text{ABS}_{595\text{nm}}$ superior a 0.6 se diluyeron convenientemente para ajustar el valor de absorbancia a la recta de calibrado.

5.2.4. Cálculo de las actividades específicas.

La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las Ecuaciones 1, 2 y 3.

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por ml.

$$\text{Unidad / ml} = \frac{\Delta\text{abs} \times \text{volumen final}_{\text{reacción}} (\text{ml})}{\text{CEM} \times \text{tiempo}(\text{min}) \times \text{volumen extracto}(\text{ml})}$$

Ecuación 2. Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

$$\text{Unidades/ mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades/ ml}}{\text{mg proteína soluble/ ml}}$$

Ecuación 3. Cálculo de la actividad en unidades por larva.

$$\text{Unidades /larva} = \frac{\text{Unidades /ml}}{n^{\circ}\text{larvas /ml}}$$

siendo;

Δabs el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda; $\text{volumen final}_{\text{reacción}}$, el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión ($\text{ml} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

5.2.5. Actividad de proteasas.

En el caso de estas enzimas las actividades se determinaron por medio de las siguientes técnicas: **1) Proteasa ácida.** Se utilizó la técnica de Anson (1938), con las siguientes modificaciones: a 1 ml de hemoglobina (0.5%) en tampón 0.1 M glicina-HCl a pH 2.0 se le añadió 20 μl de extracto enzimático. El extracto se incubó durante 30 minutos a 37 °C y la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA al 20%). Después de reposar la mezcla de reacción (15 a 30 minutos) a 4 °C, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. En el sobrenadante, se midió la cantidad de tirosina liberada ($\text{ABS}_{280\text{nm}}$) mediante un espectrofotómetro uv/visible. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μg de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (de 0 a 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2) Proteasa alcalina. Se realizó por el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 a pH 9. La reacción se detuvo con ácido Tricloroacético (TCA) al 20% y se determinó la cantidad de tirosina liberada según el protocolo descrito en el apartado anterior.

3) Tripsina. Se utilizó el método de Erlanger et al. (1961). Se preparó una solución 100 mM de BAPNA ($\text{N}\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-P-NitroAnilida) en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó a 100 ml usando tampón 50 mM de Tris-HCl y 10 mM CaCl_2 a pH 8.2. Para iniciar la reacción se mezcló 1.25

ml de sustrato (a 37 °C) con 20 μl del extracto enzimático. Después de un tiempo de incubación lineal, la reacción se detuvo con la adición de 0.25 ml de ácido acético al 30%. A continuación, se midió la absorbancia a 410 nm utilizando un blanco como control. La unidad de actividad se definió de acuerdo con Dimes et al. (1994). Una unidad de actividad es 1 μmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8800 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

4) Quimotripsina. Se determinó a 256 nm por hidrólisis de BTEE (N-Benzoil-L-Tirosina Etil Ester) a 37 °C, según la metodología descrita por Ásgeirsson y Bjarnason (1991). El método estándar para 1 ml de reacción fue el siguiente: A 0.1 ml BTEE (5mM en DMSO) se le añadieron 0.89 ml de tampón (44.4 mM Tris, 55.5 mM CaCl_2 , pH 7.8). La reacción se inició con la adición de 10 μl extracto enzimático, la reacción se detuvo después de 10 minutos hirviendo los tubos durante otros 15 minutos. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 μmol de BTEE hidrolizado por minuto usando como coeficiente de extinción molar 964 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

5) Leucina aminopeptidasa. Se determinó por el método de Maraux (1973) utilizando como sustrato Leucina p-nitroanilida (0.1 mM). Se disolvió el sustrato en 200 μl de DMSO y se aforó con 100 ml del buffer (fosfato sódico 50 mM, pH 7.2). La reacción se inició con 10 μl de extracto problema en 950 μl de sustrato, se incubó por 10 minutos a 37 °C. Se detuvo la reacción con 250 μl de ácido acético 30 % y se leyó a 410 nm. Una unidad de actividad es 1 μmol de alanina p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8200 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.6. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las proteasas.

El efecto del pH sobre la actividad proteasa ácida y alcalinas se

determinó en los extractos enzimáticos de larvas de 30 DDE. Para la determinación de las proteasas ácidas los extractos se incubaron con hemoglobina (0.5%) tamponada (pH 1 a 5) con 0.1 M Glicina-HCl, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para este tipo de proteasas. En el caso de las proteasas alcalinas, se utilizó como sustrato caseína (1 %) tamponada de pH 2 a 12 con tampón Universal (Stauffer, 1989). Todos estos ensayos se realizaron por triplicado.

El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasa ácida y alcalina se determinó preincubando los extractos a diferentes pH (2-5-7-9-12) durante 180 minutos a 25 °C en sus respectivos sustratos y después midiendo su actividad al pH normal (2 para las proteasas ácidas y 9 para proteasas alcalinas). La actividad residual se cuantificó a intervalos regulares con respecto a un control sin preincubar, siguiendo los protocolos para ambos tipos de proteasas.

5.2.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las proteasas.

Para determinar la influencia de la temperatura sobre las actividades de la proteasa ácida y alcalina se incubaron los extractos de las larvas del 30 DDE en los sustratos hemoglobina (0.5 %) y caseína (1 %) respectivamente, estabilizándolos durante 10 minutos a temperaturas comprendidas entre 10 y 70 °C. La reacción se inició por la adición del extracto. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado.

La influencia de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática se determinó preincubando los extractos a temperaturas crecientes (25, 30, 40, 50 y 60 °C) durante 180 minutos. Después de la preincubación se determinó la actividad a intervalos de tiempo regulares, tomando muestras que fueron rápidamente enfriadas en un baño de hielo a 4 °C durante 5 minutos. A continuación, se determinó la actividad residual (%) frente a un control sin preincubar.

5.2.8. Estudios de inhibición enzimática.

La caracterización del mecanismo de acción enzimática de las distintas enzimas que componen los extractos de larvas, rotíferos y *Artemia*, se realizaron de acuerdo con el método descrito por Dunn (1989).

Para la caracterización de la actividad proteasa alcalina, se incubaron los extractos con los inhibidores (PMSF, TLCK, ZPCK, SBTI¹ y ovoalbúmina) y los inactivadores quelantes (EDTA y EGTA), se mezcló el extracto enzimático (20 µl) con 0.5 ml de y 20 µl de inhibidor (concentración stock). La mezcla fue incubada durante 60 min a 37 °C, a continuación, se midió la actividad proteasa usando 0.5 ml de sustrato caseína (1 %, pH 9) a 37 °C. La actividad se expresó como el porcentaje de inhibición respecto a un control de actividad sin inhibidores (100 % de actividad). Como controles de inhibición, se ensayaron quimotripsina y aminopeptidasa bovina comercial (SIGMA) con tampón 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂, pH 7.5 y tripsina de bacalao (*Gadus morhua*) en tampón 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 9. En todos los casos cada ensayo se realizó por triplicado.

Para la caracterización de la actividad proteasa ácida se incubaron los extractos con pepstatin A (1mM, SIGMA). En este caso, 5 µl de la solución concentrada de inhibidor se preincubaron con 20 ml del extracto enzimático durante 60 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió 1 ml de sustrato (hemoglobina al 0.5% en 0.1 M Glicina/HCl, pH 2.0).

5.2.9. La actividad de esterasas no específicas y lipasas.

1) Esterasas no específicas. Se aplicó la técnica propuesta por Albro et

¹ PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonil; SBT1: inhibidor tripsico de soya; ZPCK: N-CBZ-L-fenilclorometil quetona; TLCK; N-p-tosil-L-lisina clorometil quetona; EDTA: etilendiamina tetra acetato y EGTA: etilenglicol bis-aminoetil éter N,N0-tetra acetato. Todos estos reactivos fueron obtenidos de Sigma.

al. (1985); para lo cual, se utilizaron ocho sustratos específicos con ácidos grasos de diferentes número de carbonos (C), los cuales al ser hidrolizados liberan moléculas de *p*-nitrofenil que se miden a 405 nm. Los sustratos utilizados fueron: *p*-nitrofenil acetato (2 C), butirato (4 C), caproato (6 C), caprato (10 C), laurato (12 C), miristato (14 C), palmitato (16 C) y estearato (18 C). Como primera parte, se determinó el pH óptimo para los tres principales sustratos (2, 10 y 18 C) con los extractos obtenidos de larvas del día 30. En el caso de las muestras de larvas en inanición, se probaron los ocho sustratos, mientras que para el caso de las muestras de larvas alimentadas, se realizó con los tres sustratos más representativos (2, 10 y 18 C). El ensayo de esterases se corrió de la siguiente manera: se colocaron 420 μ l de buffer universal desde 5 hasta 13 de pH (Stauffer, 1989), 50 μ l de tauracolato de sodio (10 mM), 20 μ l del sustrato (1mM), se agitó en vortex. A continuación se agregó 10 μ l de extracto problema y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Para detener la reacción se agregó 700 μ l de una solución acetona/hexano (5:2 v/v), se centrifugó (6100 rpm, 2 min., 25 °C) y se colectó la parte acuosa (inferior). Se corrió al mismo tiempo un testigo al cual se le agregó el extracto después de detenida la reacción. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado y su lectura se realizó a 405 nm.

La unidad de esterasa se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 405 nm por minuto. La actividad específica se representó como las unidades de enzima por miligramo de proteína y/o las miliunidades de enzima por larva.

2) Lipasas. Se realizó a través del método de Versaw et al (1989), en el cual a 100 μ l de tauracolato de sodio (100 mM) y a 1.9 ml de Tris HCl 50 mM (pH=7.2) se le agregó 20 μ l de extracto enzimático, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se inició la

reacción con 20 μ l de β -naftil caprilato (200mM) por 30 min a 37°C. Se le agregó 20 μ l de fast blue (100 mM) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 200 μ l de TCA (0.72 N), y se clarificó la reacción con 2.71 ml de etanol acetato de etilo (1:1 v/v). Se agitó en el vortex y se leyó la absorbancia a 540 nm en cubetas de vidrio o cuarzo.

De la misma manera, la unidad lipasa se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 540 nm por minuto. La actividad específica se representó como las unidades de enzima por miligramo de proteína y/o las miliunidades de enzima por larva.

5.2.10. Efecto del pH sobre la actividad de las lipasas.

En los extractos de larvas del día 30 se determinaron las variaciones de la actividad lipasa con el pH usando tampón Universal (Stauffer, 1989) en el rango de pH de 2 a 12 utilizando β -naftil caprilato como sustrato. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado de acuerdo al protocolo descrito anteriormente para lipasas.

5.2.11. Efecto del SDS sobre la actividad de las lipasas.

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad lipasa, se preincubaron los extractos en cantidades crecientes (0.05, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 %) de SDS (lauril doudecil sulfato sódico), utilizando β -naftil caprilato como sustrato. La actividad residual se determinó a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos), respecto a un control sin preincubar de acuerdo al apartado descrito anteriormente para lipasas. Todos los ensayos se corrieron por triplicado.

5.2.12. La actividad de las amilasas.

La actividad α -amilasa (α 1-4 glucán 4-glucanohidrolasa) de los extractos se valoró incubando a 37 °C de la siguiente forma: 10 μ l de extracto con 0.25 ml de almidón soluble 1% (p/v) en 0.25 ml de tampón 0.1M citrato-fosfato pH 7.0. Después de 30

minutos tiempo de incubación, se midieron los azúcares reductores a 600 nm usando el procedimiento descrito por Robyt y Whelan (1968). Para determinar el coeficiente de extinción molar de la maltosa se construyó una curva patrón con distintas concentraciones de maltosa. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 μ g de maltosa por minuto.

5.2.13. La actividad de las fosfatasas.

La variación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, a lo largo del desarrollo ontogénico de las larvas y los alimentos vivos, se ensayó utilizando como sustrato 4 nitrofenilfosfato. Para ello se incubó 10 μ l de extracto larvario con 0.1 ml de 4 nitrofenilfosfato al 2% en tampón 41.6 mM citrato a pH 4.8, o en tampón 97.5 mM dietanolamina a pH 9.8, para la actividad fosfatasa ácida y alcalina respectivamente. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C se detuvo la reacción con NaOH 0.05 N y se midió la absorbancia a 405 nm. La hidrólisis del sustrato por las fosfatasas libera el grupo 4-nitrofenol que produce un intenso color amarillo. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que produce un Δ ABS_{405nm} de 0.01.

5.2.14. Caracterización de proteasas alcalinas usando SDS-PAGE.

Para el estudio de las proteasas alcalinas de los extractos de larvas, rotíferos y Artemia, se realizaron electroforesis en presencia de lauril (duodecil) sulfato sódico (SDS), en condiciones desnaturalizantes, empleando un sistema discontinuo (gel almacenador preparativo y gel separador resolutivo), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970), y adaptada por García-Carreño et al. (1993) para visualizar actividad proteasa alcalina.

Las electroforesis se realizaron en la cubeta Mini PROTEAN® II (Bio-Rad) con 2 placas de geles verticales de 8×10×0.075 cm. con capacidad para 20 muestras por electroforesis. Cada placa estaba compuesta por dos tipos de gel; un gel almacenador con un 4% de poliacrilamida (PAA) y, un gel separador con un porcentaje de poliacrilamida del 12 %. En la Tabla 5 se detalla el procedimiento empleado para la elaboración de los geles de poliacrilamida. Una vez montados los cristales, se llenó primero el gel separador, dejando una hora para que polimerizase. A continuación, se preparó el gel almacenador y se colocó un peine con diez dientes para fabricar los pocillos.

Tabla 5. Protocolo de preparación de los geles de electroforesis.

Reactivo	gel almacenador (4%)*	gel separador (12%)
<i>Sol. madre de poliacrilamida</i> ¹	0.65 ml	4 ml
<i>Tampón del gel almacenador</i> ²	1.25 ml	—
<i>Tampón del gel separador</i> ³	—	2.5 ml
<i>Agua destilada</i>	3.05 ml	3.42 ml
<i>TEMED</i> ⁴	6 μ l	6 μ l
<i>Persulfato amónico (10%)</i> ⁵	50 μ l	75 μ l
Volumen final	5 ml	10 ml

¹ Solución monómera de poliacrilamida 30.8% (p/v) en agua destilada

relación acrilamida:bis-acrilamida = 30:0.8.

Una vez preparada filtrar con papel Whatman® n°1. Almacenar a 4°C en frasco de cristal topacio. La solución es estable durante 1 mes.

² Tampón Tris-HCl 0.5M pH 6.8 (4X)

³ Tampón Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (4X)

⁴ TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)

⁵ Solución extemporánea. Preparar en fresco y utilizar rápidamente.

*Para conseguir que el frente de polimerización del gel separador sea recto se utiliza isopropanol.

Preparación de las muestras para la electroforesis.

Una vez preparados los geles, los extractos se mezclaron a partes iguales con el tampón de muestra (0.125 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (p/v), 20% glicerol (v/v), 0.04% (p/v) azul de bromofenol (2X)), procurando que la concentración final de proteína soluble en la muestra fuera de 1,5 a 3 mg/ml,

para aplicar 35 a 40 µg de proteína por pocillo. El azul de bromofenol es un colorante trazador que permite visualizar el frente de electroforesis.

En todas las electroforesis se utilizó un patrón comercial, LWM de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suiza) compuesto por seis proteínas de peso molecular conocido (Tabla 6).

Tabla 6. Composición del marcador de peso molecular (LMW).

Proteína	Mr (kDa)	Fuente
<i>Fosforilasa b</i>	94	músculo de conejo
<i>Albúmina</i>	67	suero bovino
<i>Ovoalbúmina</i>	43	clara de huevo
<i>Anhidrasa carbónica</i>	30	eritrocito bovino
<i>Inhibidor tripsico de soya</i>	20.1	soya
<i>α-Lactoglobulina</i>	14.4	leche bovina

El patrón se preparó disolviendo 600 µg de proteína en 100 µl de tampón que contenía 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2.5% SDS y 0.04% azul de bromofenol. Este se hirvió durante 5 minutos a 100 °C.

Una vez montados los geles en la cubeta, se vertió el tampón de electroforesis 0.025M Tris, 0.192 M glicina, pH 8.3; 0.1% SDS (p/v), y a continuación se aplicaron las muestras (máx. 35 µl por pocillo, excepto para el marcador de pesos moleculares que se aplicó siempre 5 µl en cada gel) por medio de una jeringa HAMILTON Microliter®. En todos los geles se desecharon los pocillos de los extremos.

Condiciones del desarrollo de la electroforesis.

Una vez dispensadas las muestras en los pocillos, se colocó la cubeta en una cámara a 4 °C y se conectó a una fuente de alimentación desarrollándose la electroforesis a voltaje constante de 200 volts (100 voltios por gel) e intensidad de 120 mA (60 mA por gel) durante unos 45 minutos.

Procesado de los geles de electroforesis.

Para detectar actividad proteasa alcalina, seguido a la electroforesis, se sumergieron los geles en una solución de caseína Hammerstein al 1% tamponada en 50 mM TRIS-HCl, pH 9, durante 30 minutos a 5°C. A continuación se pasaron a otra solución similar a 37 °C durante 90 minutos, en ambos casos sin agitación. Seguidamente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 12%.

Tinción.

Para la tinción se utilizó la metodología de Weber y Osborn, (1969) con algunas modificaciones. Los geles permanecieron durante toda la noche y a temperatura ambiente en la solución de tinción compuesta de 0.1% azul brillante de Coomassie (BBC R-250) en metanol: ácido acético y agua destilada (50:20:50). Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol: ácido acético: agua (35:10:55). Durante este proceso se pudo ver las bandas claras sobre un fondo azul intenso (caseína embebida en el gel) que corresponde a proteínas

con actividad proteolítica. Una vez desteñidos después de varios lavados, los geles se sumergieron en agua destilada para que se hidraten.

Fotografiado.

Para el fotografiado se colocaron los geles sobre dos hojas de acetatos, y posteriormente fueron digitalizados con la ayuda de un escáner HP 3400 C.

Parámetros empleados para la caracterización las fracciones proteicas.

Los parámetros que se emplearon para caracterizar las bandas de actividad proteasa presentes en los electroforegramas fueron los siguientes:

- a) R_{mb} o electromobilidad absoluta: es la distancia, en mm, desde el extremo catódico del electroforegrama (comienzo del gel separador) hasta el margen superior de la banda proteínica (Igbokwe y Downe, 1978).
- b) R_f o electromovilidad relativa: se definió como el cociente entre la electromovilidad absoluta (R_{mb}) y la distancia desde el origen hasta un punto de referencia (normalmente el frente de electroforesis).
- c) Masa molecular (Mr): La determinación de la masa molecular (en Daltons o Kilodaltons) se basa en la relación lineal entre la movilidad relativa de una proteína y el logaritmo decimal de su masa molecular (Laemmli, 1970). Para el cálculo del peso molecular se procedió a construir una recta de regresión lineal representando en abscisas la electromovilidad relativa de las proteínas patrón empleadas (LMW) frente al logaritmo decimal de sus pesos moleculares. De este modo, se determinó la ecuación de la recta, así como los pesos moleculares de las proteasas presentes en los distintos extractos.

5.2.15. Caracterización de proteasas ácidas usando PAGE.

Preparación de los geles, muestras y condiciones de electroforesis.

Las electroforesis para proteasas ácidas se prepararon bajo condiciones nativas de acuerdo a lo propuesto por Davis (1964) en geles de poliacrilamida al 10 %. El protocolo de preparación fue el siguiente: se mezcló 5 ml de agua destilada, 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 2.5 ml de Acrilamida/bis (30 % stock), 10 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina), con agitación constante, después se agregó 100 µl de persulfato de amonio (10 %) para lograr la polimerización. El corrimiento se realizó por medio de una preestabilización de los geles a 80 V por 15 minutos, para después incrementarse a 120 V por 45 minutos.

Procesado de los geles de electroforesis.

Para la detección de actividad proteolítica ácida en los geles se sumergieron en una solución de HCl 0.1 M hasta reducir su pH a 2 (el marcador del tampón de muestra se puso amarillo). A continuación se colocaron en frío (4 °C) en una solución de hemoglobina al 0.25 % en tampón 0.1 M glicina-HCl, pH 2.0, transcurridos 30 minutos se pasaron a otra solución similar a 37 °C por un tiempo de 90 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA 12%).

El procedimiento para la tinción y fotografiado fue al descrito para las proteasas alcalinas. Las bandas de actividad proteasa presentes en los electroforegramas fueron caracterizadas por los mismos parámetros descritos en el párrafo anterior excepto para la determinación de la masa molecular.

5.2.16. Caracterización de lipasas usando PAGE.

Se realizaron electroforesis (PAGE) y zimogramas en geles de poliacrilamida al 10 % bajo condiciones nativas siguiendo la

técnica propuesta por Davis (1964). La técnica para la elaboración de este tipo de geles fue descrita anteriormente para las proteasas ácidas. Tanto las electroforesis como los zimogramas fueron realizadas con la misma concentración de proteína (40 µg) con el objetivo de hacer comparable la intensidad de las bandas de actividad. Para este tipo de zimogramas se utilizó como sustrato una solución de β-naftil caprilato (200mM) embebido en el gel. Para embeber el sustrato dentro del gel se siguió el siguiente procedimiento: Se agregó 2.5 ml de la solución de poliacrilamida junto con 2 ml del sustrato β-naftil caprilato (200 mM), 1 ml de taurcolato de sodio (10 mM), 2.5 ml de tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 2 ml de agua destilada y 9 µl de TEMED. Se agitó continuamente la mezcla por 15 minutos y se agregó 100 µl de persulfato de amonio (1 %) hasta la polimerización del gel. Los geles se estabilizaron por 15 minutos a 80 V, y se incrementó a 120 V por 2 h a 4 °C. Para realizar el revelado de los geles, se les agregó suavemente una solución de fast blue (100 mM) hasta observar las bandas de actividad lipasa.

5.2.17. Caracterización de lipasas usando SDS-PAGE.

La preparación de los geles para la detección de lipasas usando SDS-PAGE, fue la técnica propuesta por Laemmli (1970) y descrita anteriormente para proteasas alcalinas usando geles al 12 %, agregando 100 µl de SDS. Durante el corrimiento tanto de los electroforegramas y los zimogramas se utilizó la misma concentración de proteína por pocillo (40 µg) de tal manera que no se excediera de una cantidad total de 20 µl por pocillo. El procedimiento para embeber el sustrato en el gel fue descrito en el párrafo anterior. Las electroforesis fueron realizadas utilizando un voltaje constante (120 V) por una hora a 4 °C. Una vez terminado el corrimiento, los geles se

enjuagaron con agua destilada y se colocaron en cámara húmeda a 37 °C por 30 minutos. El revelado y fotografiado de los geles se realizó de la misma manera que en el apartado anterior.

5.2.18. Caracterización de amilasas usando PAGE.

Esta técnica fue aplicada solamente para las muestras de larvas en inanición desde el embrión (0 DDE) hasta las larvas del día 5 DDE; para lo cual se prepararon geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones nativas (Davis, 1964), de la misma manera que para la determinación de proteasas ácidas, para permitir la detección de las bandas con actividad amilasa. Para lo cual se realizó el corrimiento a 100 V por gel durante 45 minutos a 4 °C. Para revelar la actividad amilasa, los geles fueron incubados en una solución de almidón (0.5 %) por 12 h a 37 °C. Una vez terminada la incubación, se enjuagaron con agua destilada y reveló su actividad con una solución de yodo (1 %).

5.2.19. Caracterización de amilasas usando SDS-PAGE.

La preparación de los geles para la detección de amilasa usando SDS-PAGE, fue la técnica propuesta por Laemmli (1970) y descrita anteriormente para proteasas alcalinas usando geles al 10 %. Durante el corrimiento tanto de los electroforegramas y los zimogramas se utilizó la misma concentración de proteína por pocillo (40 µg) de tal manera que no se exceda de una cantidad total de 20 µl por pocillo. La técnica se corrió de acuerdo a la técnica propuesta por Lacks y Springhorn (1980) y modificada por Martínez et al. (2000). Los geles se estabilizaron por 15 minutos a 80 V, y se incrementó a 100 V por 45 min. La actividad enzimática se reveló después de enjuagarlos con agua destilada por 15 min para eliminar el exceso de detergente. Después los geles fueron incubados en una

solución de almidón al 2% en una solución amortiguadora de citrato fosfato (0.1 M), 500 mM de Na Cl, pH 7.5 por 30 minutos a 5 °C y transferidos a la misma solución a 37 °C por 1 hora sin agitación. Los geles fueron enjuagados y teñidos con una solución de yodo/ioduro de potasio. El fotografiado se realizó de la misma manera descrita anteriormente.

5.2.20. Estudios de inhibición por técnicas electroforéticas para proteasas alcalinas y ácidas.

Inhibición enzimática.

El estudio de proteasas se complementó mediante electroforesis SDS-PAGE y el uso de inhibidores. Se estudió la evolución de las proteasas alcalinas con objetivo de cuantificar el número de bandas caseinolíticas, así como su masa molecular. Además de establecer los tipos de proteasas que componen los extractos.

Para realizar este estudio se incubaron los extractos de las larvas del día 30 DDE en los mismos inhibidores descritos anteriormente en la sección 5.2.8, por 1 h, para después tomar 40 µl del extracto mezclado con la solución inhibidora y realizar la electroforesis bajo las mismas condiciones (SDS-PAGE) descritas anteriormente para proteasas alcalinas. Una vez realizada la electroforesis, se incubaron los geles en una solución de caseína Hammerstein al 1% tamponada en 50 mM TRIS-HCl, pH 9, durante 30 minutos a 5°C. A continuación se pasaron a otra solución similar a 37 °C

durante 90 minutos, en ambos casos sin agitación. Seguidamente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 12 %. Para la tinción se utilizó la metodología de Weber y Osborn, (1969) con algunas modificaciones. Los geles permanecieron durante toda la noche y a temperatura ambiente en la solución de tinción compuesta de 0.1% azul brillante de Coomassie (BBC R-250) en metanol: ácido acético y agua destilada (50:20:50). Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol: ácido acético: agua (35:10:55). Una vez revelada la actividad, se determinó el número de bandas con actividad proteolítica residuales, comparándolas con un control sin inhibidor.

En el caso de la inhibición de proteasas ácidas, el extracto de larvas de 30 DDE se incubó en una solución de Pepstatin A por 1 h, para después realizar la electroforesis y su revelado de la misma manera que en el apartado de zimogramas de actividad proteasa ácida.

5.2.21. Análisis estadístico.

Solamente se realizaron análisis estadísticos de la actividad enzimática entre larvas en inanición y alimentadas (días 2, 3 y 4 DDE). Se les realizó pruebas de normalidad y homoscedasticidad; al no cumplir con estos postulados se aplicaron pruebas de U de Mann-Whitney. Para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v 6.0.

5.3. RESULTADOS.

5.3.1. Crecimiento y supervivencia.

El peso seco promedio de las larvas se calculó a lo largo del tiempo como se muestra en la Figura 3, donde

se observa una caída del peso desde el huevo hasta el día 1 DDE. A partir del día 2 DDE se incrementa el peso de forma exponencial hasta el final de su crianza.

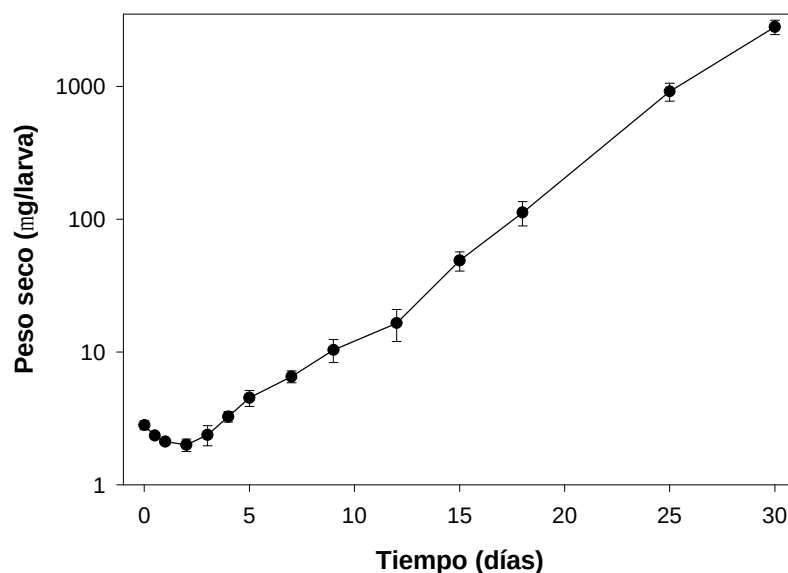


Figura 3. Peso seco promedio ($\mu\text{g/larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$) de larvas de la cabrilla arenosa durante su cultivo.

Al comparar el crecimiento de las larvas en inanición contra las larvas alimentadas se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) teniendo un mayor

peso de las larvas que fueron alimentadas a partir del primer día DDE (Fig. 4).

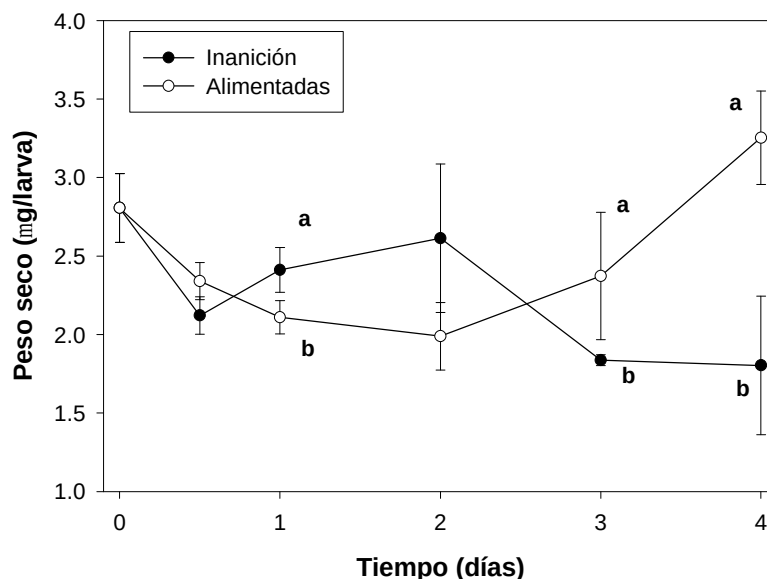


Figura 4. Comparación del peso seco ($\mu\text{g/larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$) entre larvas alimentadas y en inanición. Las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre días.

5.3.2. Proteína soluble.

En los extractos de las larvas alimentadas, la concentración de proteína soluble (mg/ml) se mantuvo constante a lo largo del tiempo. Al expresarla en función del número de organismos (mg/larva), la concentración de proteína soluble fue aumentando

conforme el periodo de muestreo avanzó, Encontrándose una relación exponencial a partir del día 3 DDE, mientras que en las larvas en inanición, se observó una caída de la concentración a partir del día 2 DDE (Fig. 5).

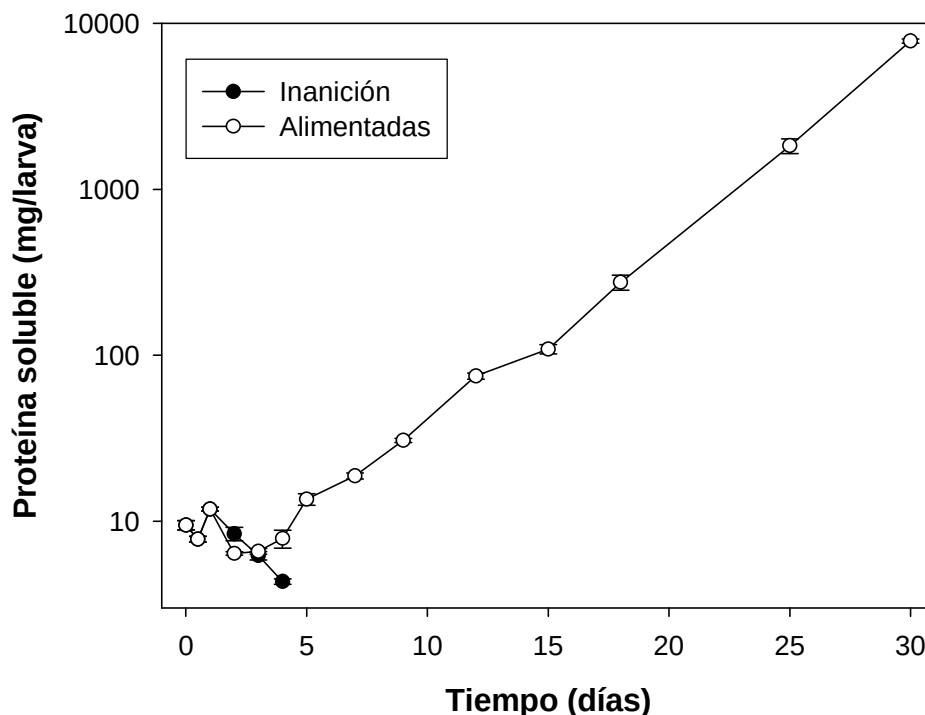


Figura 5. Concentración de proteína soluble (mg/larva $\pm$ desv. est., n=3) en larvas de la cabrilla arenosa alimentadas y en inanición.

5.3.3. Ontogenia de las actividades de proteasas alcalinas.

Las proteasas alcalinas, expresadas en U/mg de proteína (Fig. 6a), mostraron fluctuaciones a partir del día 2 DDE con incremento en su actividad hasta el día 4, una caída en el día 5 y nuevamente un incremento para el día 7, hasta alcanzar su máxima actividad en el día 12 y mantenerse alta hasta el día 20, para finalmente disminuir para el día 25 y 30 DDE.

Al realizar la transformación a mU/larva (Fig. 6b) se observa una tendencia exponencial a partir del día 3 y hasta el día 4 DDE, para después mantenerse constante hasta el día 7 e incrementarse fuertemente hasta el día 20 DDE, momento en el cual, la actividad sigue en aumento hasta el final de la crianza, aunque de forma menos pronunciada.

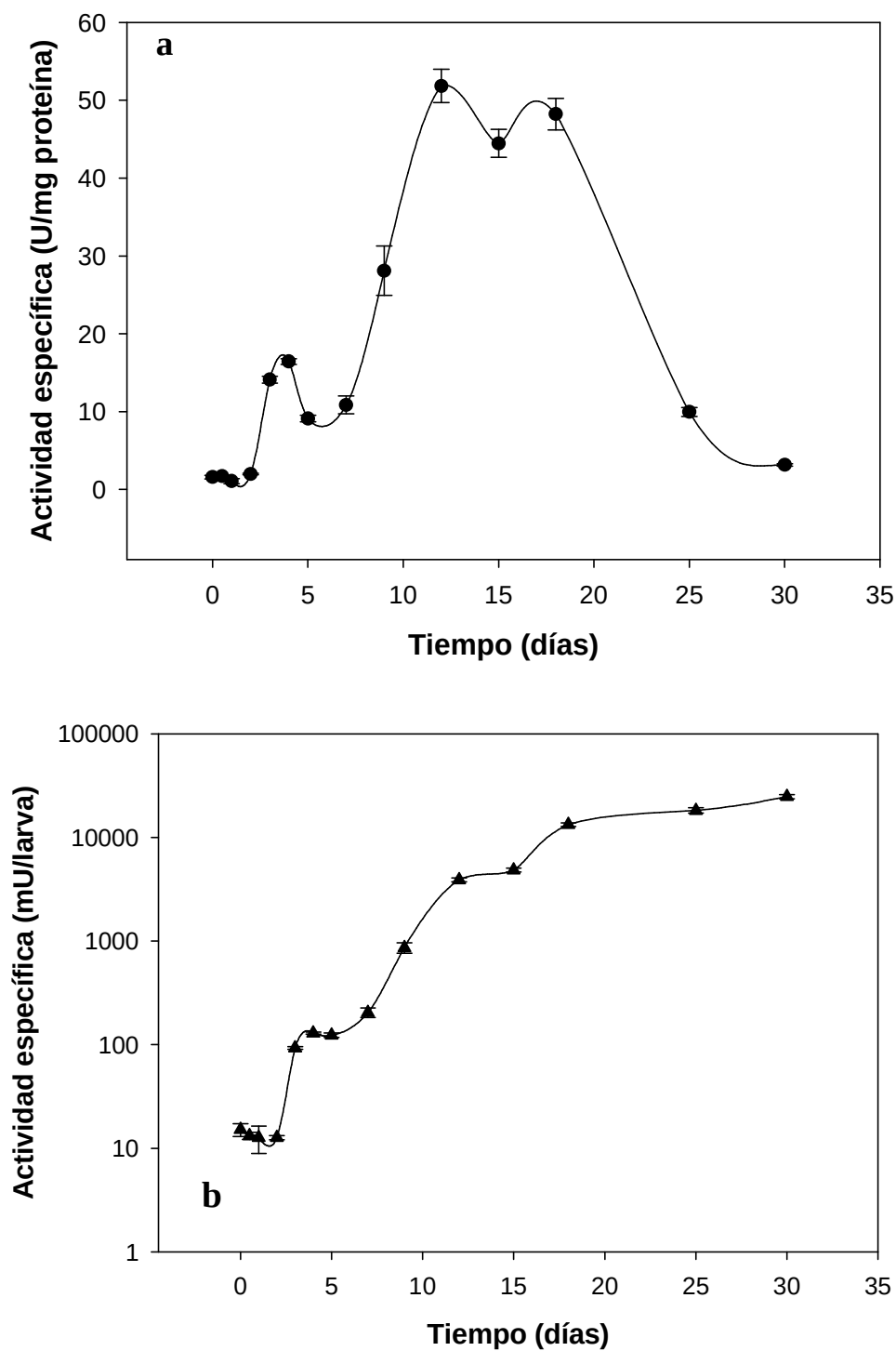


Figura 6. Actividad de proteasas alcalinas durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., $n=3$), b) Actividad específica (mU/larva $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.4. Ontogenia de las actividades de proteasas ácidas.

La actividad específica de proteasas ácidas aparece a partir del día 12 DDE, manteniéndose constante hasta el día 25 y para el día 30 incrementa su actividad (Fig. 7a).

Al realizar la transformación a mU/larva y ajustando los datos a una escala exponencial, la actividad de esta enzima se mantiene baja en los primeros días (12 al 25 DDE), mientras que para el día 30 DDE se observa un fuerte incremento (Fig 7b).

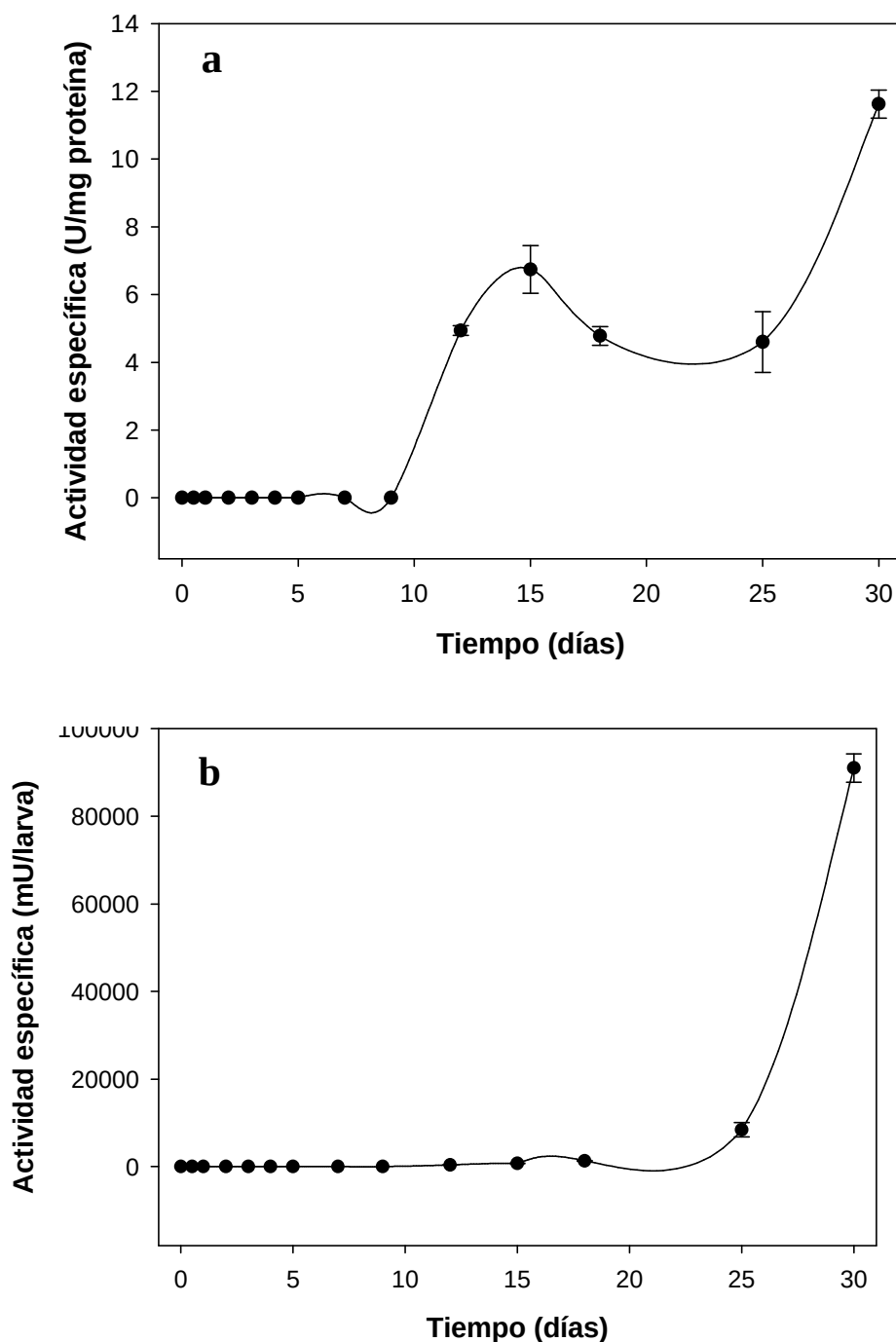


Figura 7. Actividad de proteasas ácidas durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., $n=3$), b) Actividad específica (mU/larva $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.5. Relación entre proteasas alcalinas y ácidas.

La relación de estas dos enzimas en actividad específica muestra que la actividad de proteasas alcalinas fue la mayor en comparación con la actividad de proteasas ácidas, salvo que el día 25 DDE comienza un incremento en la actividad de proteasas ácidas, que para

el día 30 es superior al de las proteasas alcalinas (Fig. 8a).

Al realizar la comparación en mU/larva, se observó el mismo comportamiento, ya que a partir del día 30 DDE, las proteasas ácidas se convierten en las enzimas con mayor actividad (Fig. 8b).

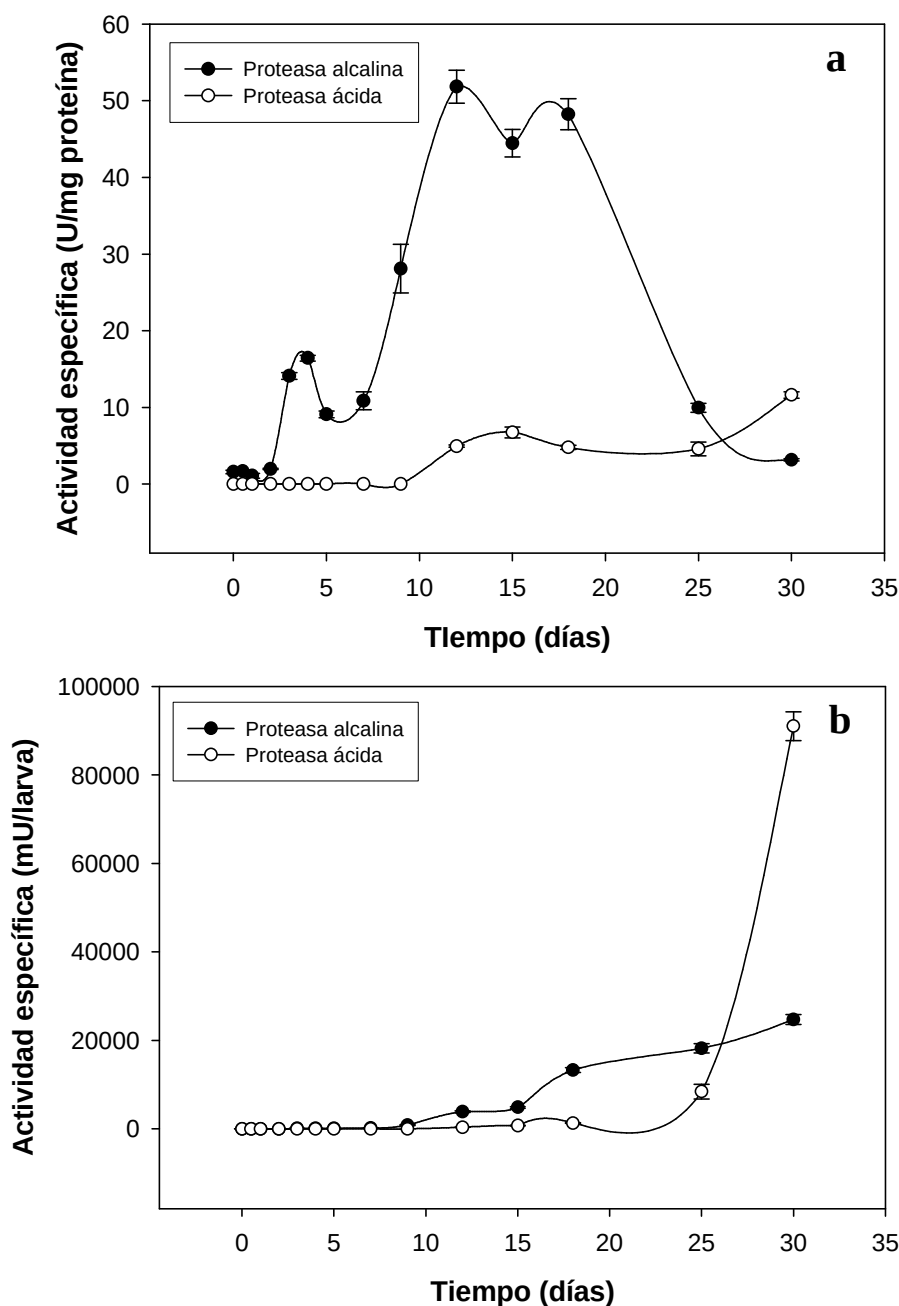


Figura 8. Comparación de las actividades de proteasas ácidas y alcalinas durante el larvicultivo de la cabrilla arenera. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., $n=3$), b) Actividad específica (mU/larva $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.6. Ontogenia de proteasas alcalinas usando SDS-PAGE.

El zimograma de proteasas alcalinas en condiciones desnaturalizantes durante la ontogenia de las larvas de la cabrilla arenera, mostró la presencia de diferentes bandas con actividad. A partir del día 2 DDE, solamente se observaron 2 bandas con actividad, correspondientes a 26,000 y 24,000 daltons aproximadamente. Para el día 3 y hasta el día 5 DDE, se resaltaron 2 grupos de bandas con actividad: el primero grupo, de alto peso molecular, donde se observaron 2 bandas con pesos moleculares aproximados de 49,000 y 48,000 daltons, y el segundo grupo de bandas de bajo peso molecular, que son las mismas bandas de actividad observadas en los dos primeros días. Cabe mencionar que estas bandas de menor peso molecular fueron conservativas a lo largo de la ontogenia, aunque su actividad fue variable dependiendo el día.

Para el día 7 y en adelante, las bandas de mayor peso molecular desaparecen. Sin embargo, en el día 15

DDE, aparecen en el grupo de las bandas de bajo peso molecular dos nuevas bandas correspondientes a los 31,000 y 27,000 daltons, que se mantuvieron hasta el final del período larvario, aunque su actividad decayó para el día 30 DDE. En el mismo momento de realizar las electroforesis de los extractos enzimáticos de las larvas, se probaron extractos enzimáticos de los diferentes alimentos vivos (rotífero, nauplio de Artemia y Artemia adulta), con el objetivo de determinar si las bandas de estos alimentos correspondían a las presentes en los extractos de larvas. Sin embargo, en el caso de los rotíferos y los nauplios de Artemia, no fue posible observar bandas con actividad de proteasas alcalinas. Para la Artemia adulta, se pudieron revelar dos bandas con actividad proteolítica, la primera de muy alto peso molecular correspondiente a los 68,000 daltons y la segunda de muy bajo peso molecular con un peso aproximado de 19,000 daltons, que aparentemente no fueron observadas en los extractos de las larvas (Fig. 9).

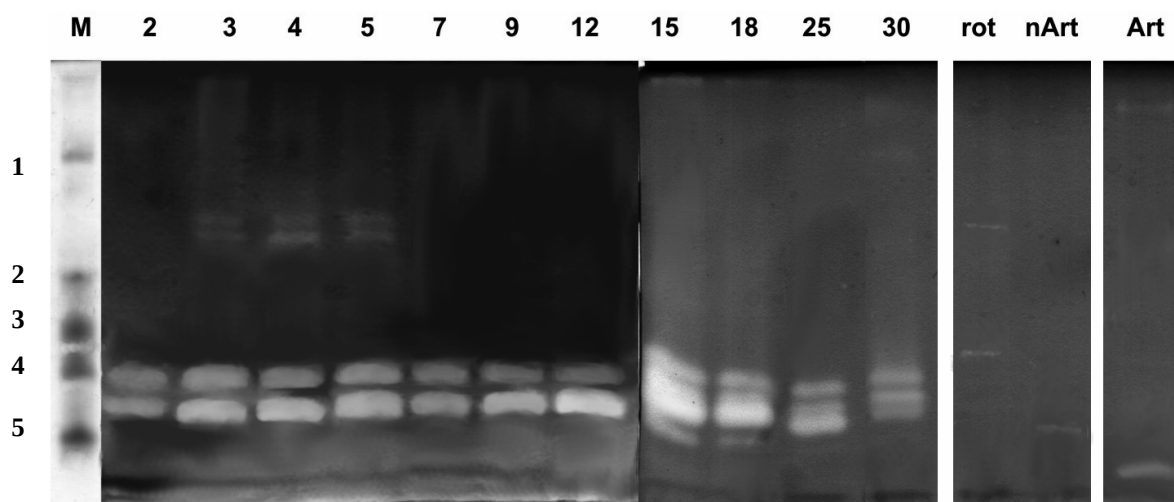


Figura 9. Zimograma de la ontogenia de la actividad proteasa alcalina en condiciones desnaturalizantes. M: marcador de pesos moleculares en dalton: 1) albúmina bovina sérica, 66000; 2) ovoalbúmina, 45000; 3) gliceraldehído 3P deshidrogenasa, 36000; 4) anhidrasa carbónica, 29000; 5) tripsinógeno, 24000. Los números superiores indican los días después de la eclosión; rot: rotífero; nArt: nauplio de Artemia; Art: Artemia adulta.

5.3.7. Ontogenia de proteasas ácidas usando PAGE.

El zimograma de la actividad de proteasas ácidas se corrió en condiciones nativas, observándose una sola banda con actividad desde el día 12 DDE con un r_f aproximado de 0.75. Esta banda fue incrementando su actividad

hasta alcanzar su máximo para el día 30 DDE. Asimismo, se corrió un zimograma con un extracto preparado de pepsina porcina, el cual mostró una sola banda de actividad que tuvo un r_f de corrimiento de 0.72, similar al observado las larvas de la cabrilla (Fig. 10).

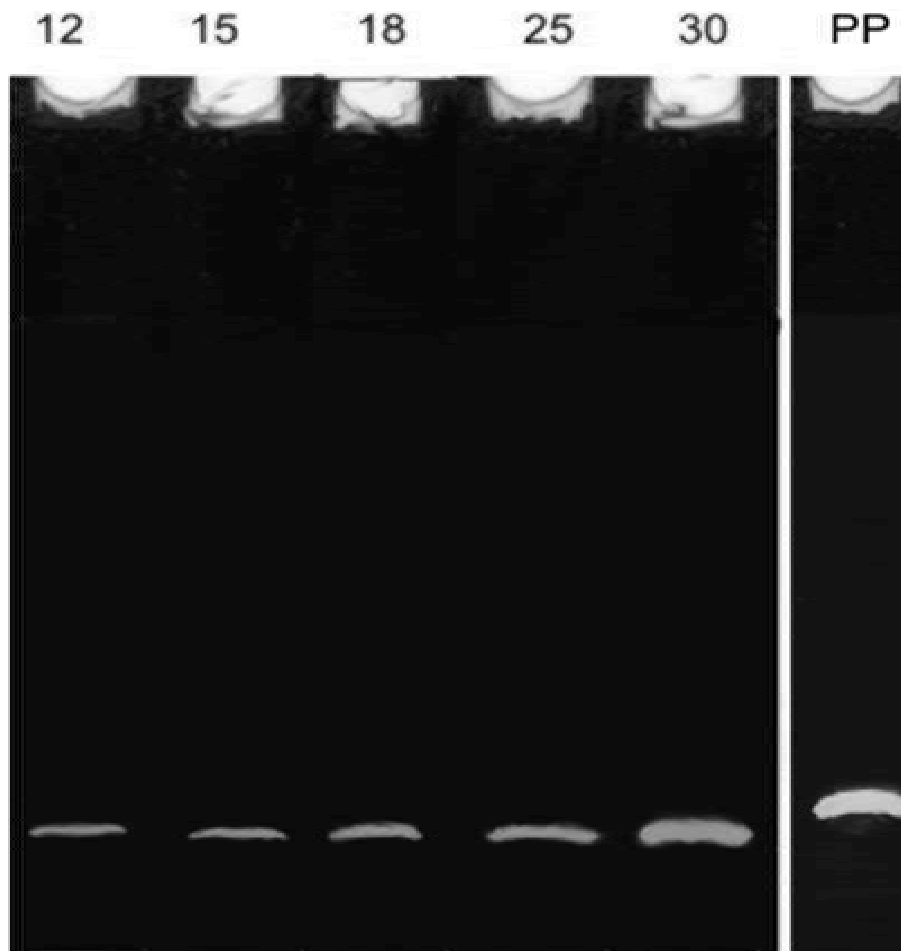


Figura 10. Zimograma de la ontogenia de la actividad proteasa ácida en condiciones nativas. Los números indican los días después de la eclosión; PP: Pepsina porcina.

5.3.8. Ontogenia de la actividad tripsina.

La actividad tipo tripsina, presentó el mismo patrón que la actividad de proteasas alcalinas, es decir, incrementó para el día 3 DDE, cayó ligeramente para el día 7, se incrementó fuertemente hasta alcanzar

su máximo de actividad para el día 12 y manteniéndose así hasta el día 18 DDE, para finalmente decaer nuevamente para el día 25 y 30 DDE (Fig. 11a). Al expresar la actividad tripsina en $mU \times 10^{-3}/larva$, se observó un ligero incremento de la actividad desde el día 2 (absorción de vitelo) hasta el día 5 DDE

manteniéndose esta actividad constante hasta el día 7 DDE, para después elevar su actividad de manera exponencial

hasta el día 30 DDE, de la misma manera que en la actividad de proteasas alcalinas (Fig. 11b).

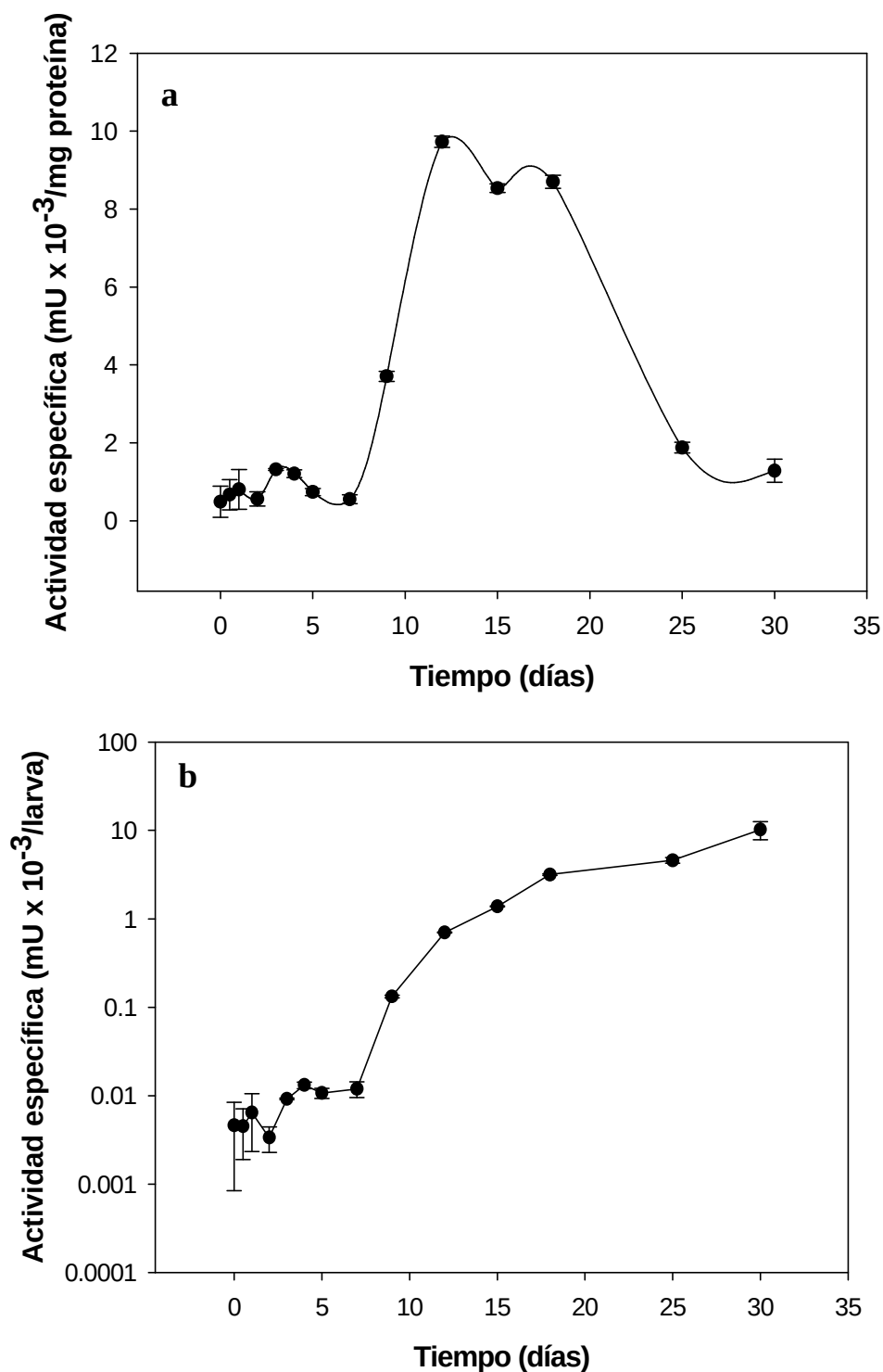


Figura 11. Actividad tripsina durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (mU x 10⁻³/mg proteína ± desv. est., n=3), b) Actividad específica (mU x 10⁻³/larva ± desv. est., n=3).

5.3.9. Ontogenia de la actividad quimotripsina.

Este tipo de actividad enzimática, muestra un patrón diferente al de las proteasas alcalinas y la tripsina, siendo relativamente mayor su actividad. Se detectó un incremento muy marcado de la actividad específica, a partir del día 2 DDE (absorción de vitelo), una caída para el día 4 DDE, nuevamente un incremento de la actividad para el día 5 DDE, hasta alcanzar su máxima

actividad en el día 9, tres días antes que las otras actividades proteolíticas. Este máximo de actividad se mantiene relativamente constante hasta el día 18 DDE, para después decaer nuevamente para el día 25 y 30 DDE (Fig. 12a). Al expresar esta actividad en $\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva}$, se observó un incremento exponencial de la actividad a partir de la absorción del vitelo (2DDE) y hasta el final del período larvario (Fig. 12b).

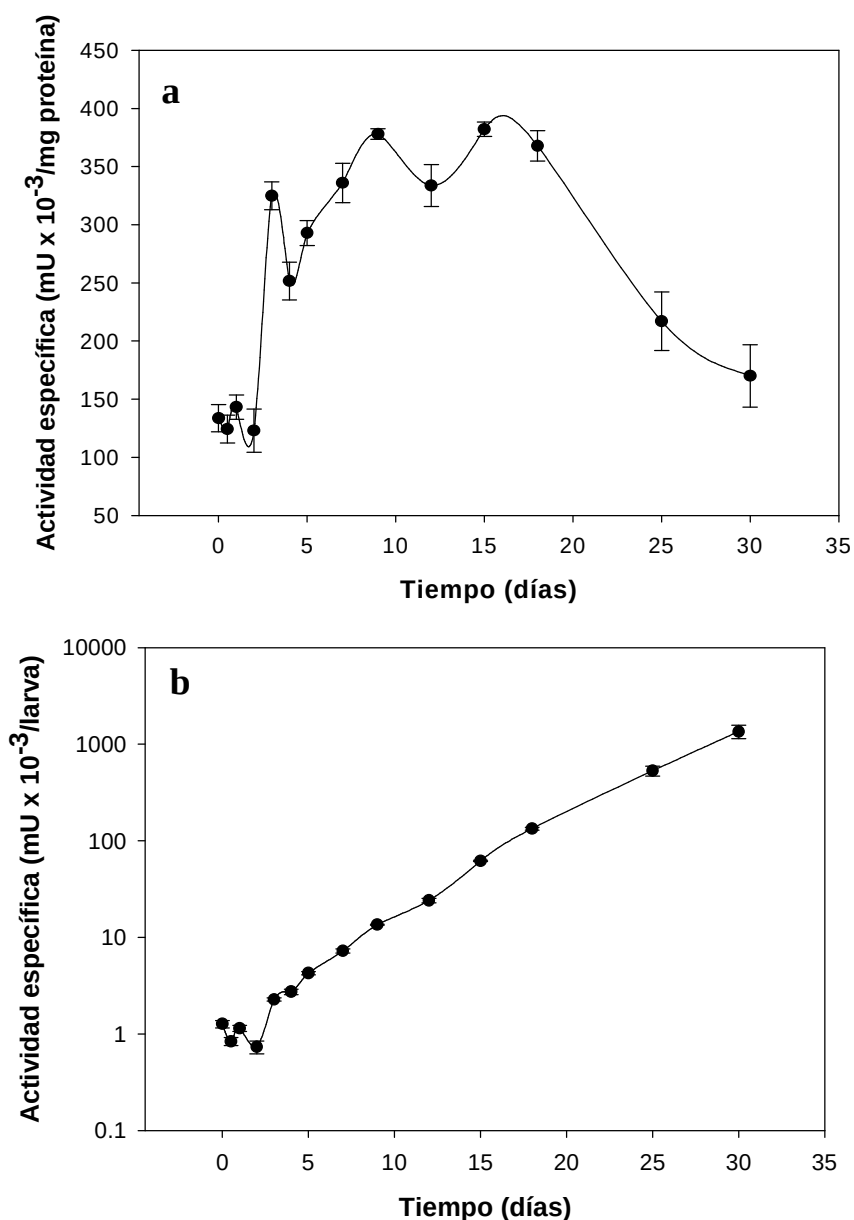


Figura 12. Actividad quimotripsina durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{mg proteína} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$).

5.3.10. Ontogenia de la actividad leucina aminopeptidasa.

En el caso de esta exopeptidasa, se observó una relación parecida a la de las proteasas alcalinas y la tripsina, donde a partir de la absorción de vitelo (2 DDE), se incrementó la actividad manteniéndose constante hasta el día 9 DDE. En el día 12 DDE se observó el único pico de máxima actividad, para después decaer rápidamente para el día

15 DDE, y nuevamente permanecer constante hasta el día 30 DDE (Fig. 13a). Al expresar la actividad en $\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva}$, se observó un incremento exponencial de la actividad a partir de la absorción de vitelo (2 DDE) hasta el día 12 DDE. Esta actividad se mantiene constante hasta el día 15 DDE, para después continuar incrementándose de forma exponencial hasta el día 30 DDE (Fig. 13b).

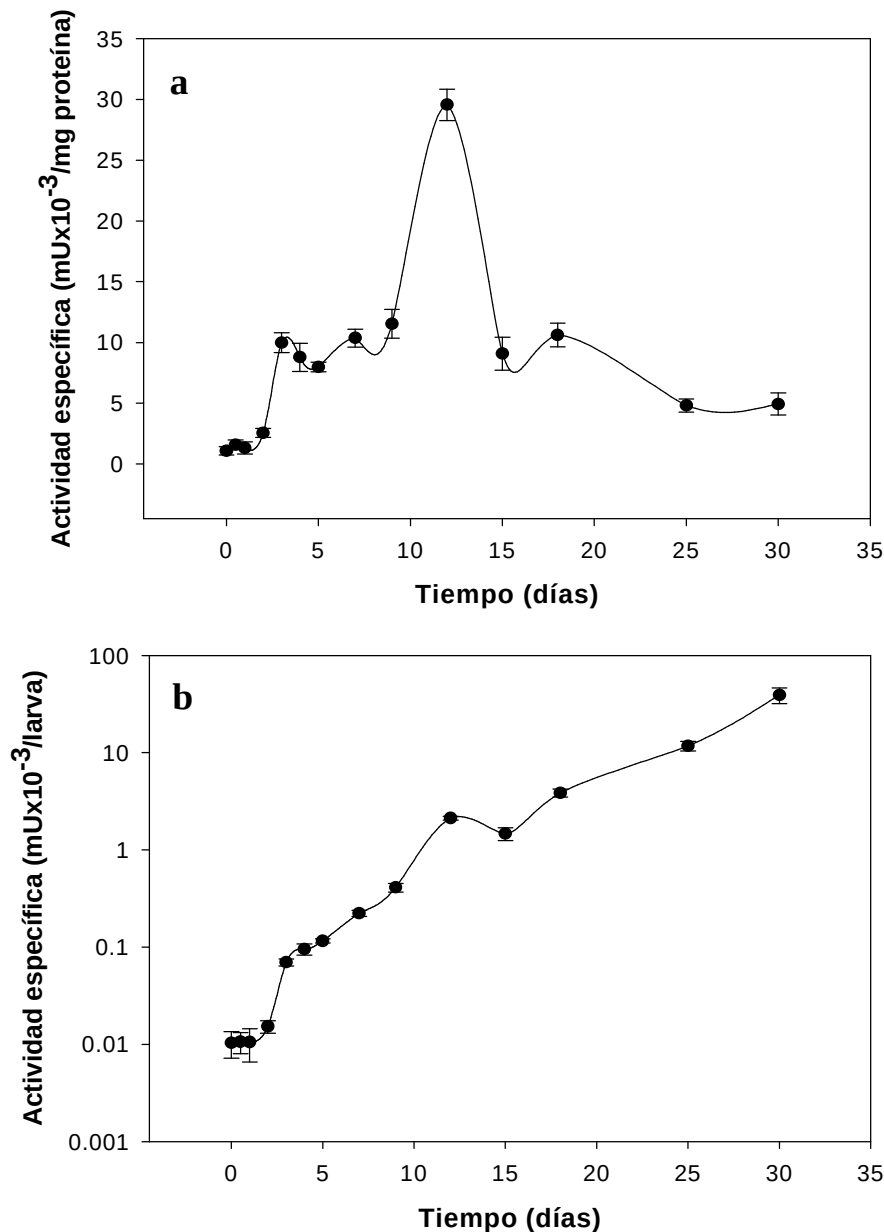


Figura 13. Actividad leucina aminopeptidasa durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{mg proteína} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$), b) Actividad específica ($\text{mU} \times 10^{-3}/\text{larva} \pm \text{desv. est.}$, $n=3$).

5.3.11. Efecto del pH sobre la actividad esterasa no específica.

Con el objetivo de determinar el pH adecuado utilizando los compuestos a base de p-nitrofeniles (PNF-) y el estudio de diferentes longitudes de ácidos grasos durante la ontogenia de las larvas de la cabrilla arenera, se evaluó el pH óptimo para la actividad esterasa no específica en los extractos de las larvas del día 30 DDE. Este estudio demostró que se trata de enzimas alcalinas con alta actividad a pH por arriba de 7, por lo cual los siguientes experimentos se realizaron a este pH. Por otra parte, existen variaciones en cuanto al pH óptimo dependiendo del tamaño de la cadena del ácido graso, ya que se observaron diferencias tanto en la actividad como en el valor de pH en el que funcionan mejor los extractos multienzimáticos para esos sustratos. En el caso del sustrato de cadena corta (2

carbonos, p-nitrofenil acetato), se observó que el máximo nivel de actividad está entre 7.5 y 9 de pH (9.5 U/mg de proteína como valor máximo en un pH de 8.5) (Fig. 14a). En el caso de la cadena media (10 carbonos, p-nitrofenil caprato), se denotó un pico máximo de actividad a un pH de 9, alcanzando hasta 21 U/mg de proteína, siendo el valor de actividad más alto de los tres sustratos probados (Fig. 14b). Finalmente, el sustrato de cadena larga (18 carbonos, p-nitrofenil estearato), mostró fluctuaciones en los valores de pH considerando entre 7 y 9 los valores más confiables (0.76 U/mg de proteína como valor máximo en un pH de 7.5); después de estos valores se observó una caída de la actividad específica y luego un incremento en la misma probablemente debido a la interferencia de los productos de hidrólisis o a la misma hidrólisis espontánea del sustrato (Fig. 14c).

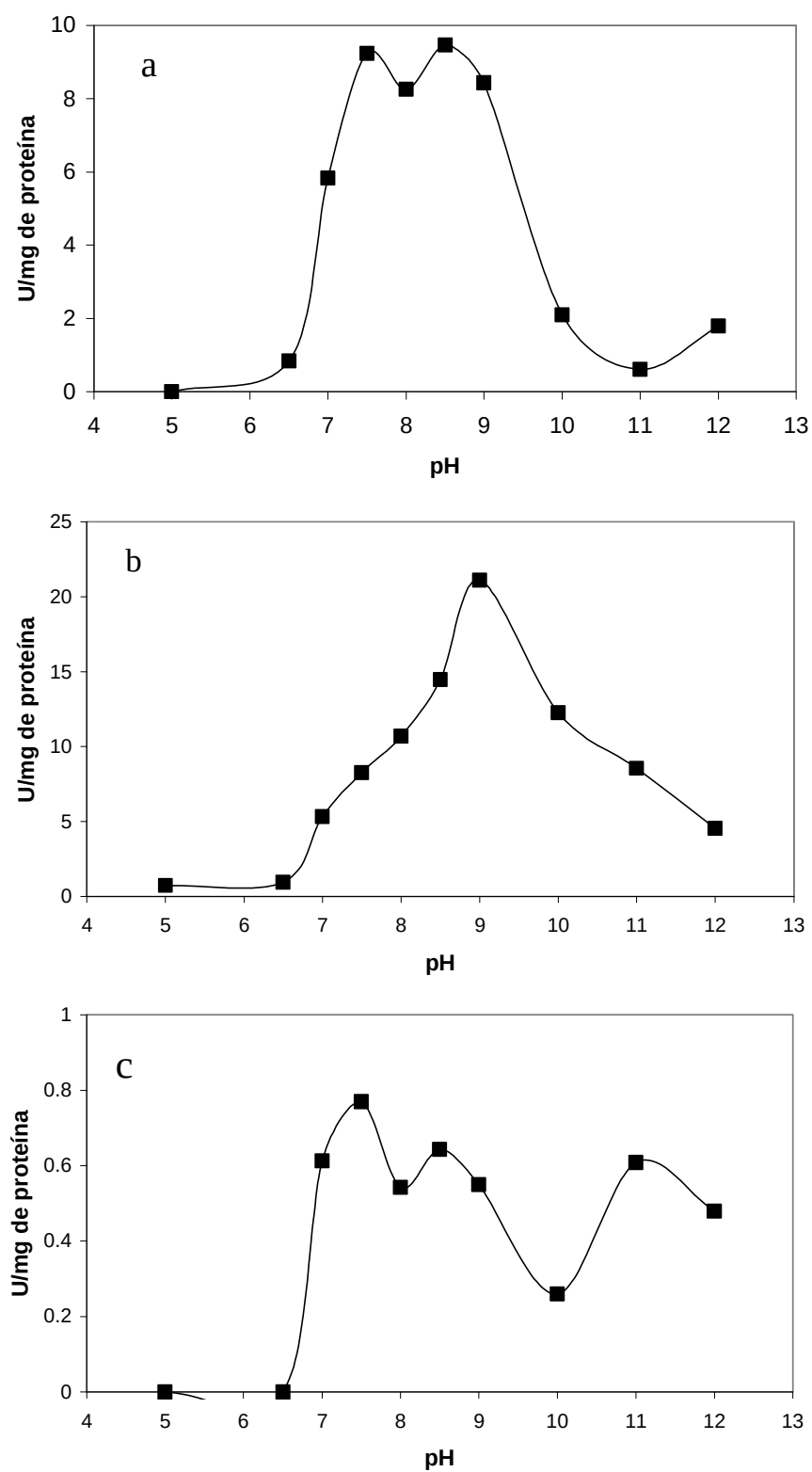


Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad lipasa utilizando. a) PNF-acetato, b) PNF-caprato y c) PNF-estearato.

5.3.12. Ontogenia de la actividad esterasa no específica.

La actividad esterasa no específica de las larvas en inanición disminuyó a partir del 2 DDE para los siete de los ocho sustratos probados (excepto PNF-acetato) (Fig. 15). Se observó una

relación inversa entre el tamaño de la cadena de carbono y la capacidad hidrolítica de los extractos multienzimáticos, que denotan que en la medida que un ácido graso es de mayor tamaño, la actividad específica disminuye.

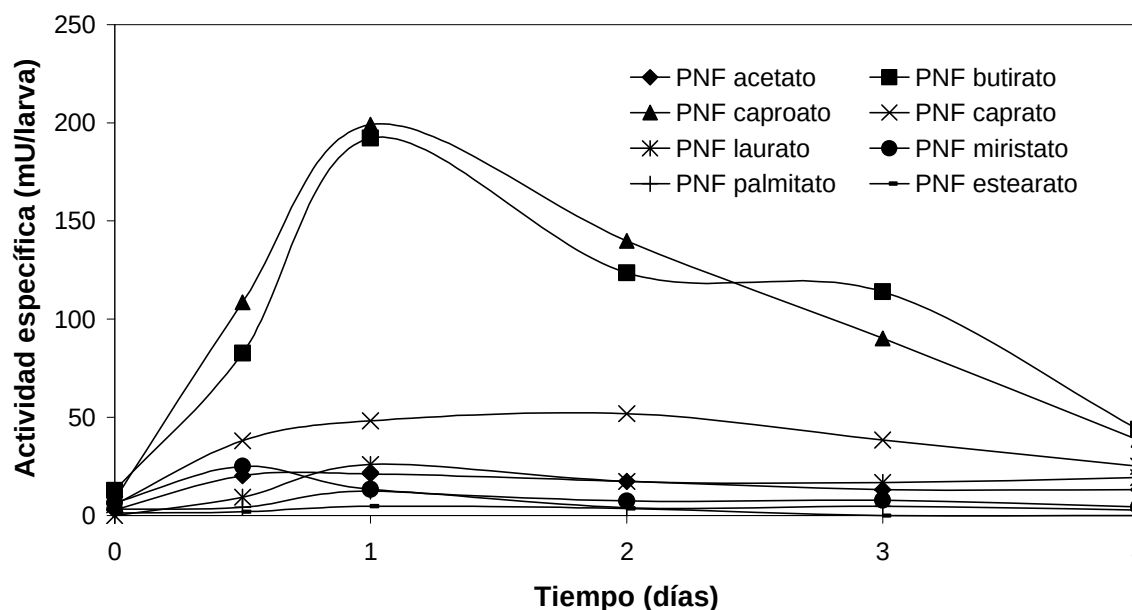


Figura 15. Comparación de la actividad esterasa no específica de larvas en inanición con los ocho sustratos probados.

Al comparar la actividad esterasa de las larvas en inanición contra la de las larvas alimentadas para los sustratos de cadena pequeña (AG de 2 carbonos, PNF-acetato), cadena media (AG de 8 carbonos, PNF-caprato) y de cadena

larga (AG de 18 carbonos, PNF-estearato), se observó que a los 2 DDE hay un cambio de las actividades, siendo mayor la actividad para las larvas alimentadas independientemente de los sustratos probados (Fig. 16).

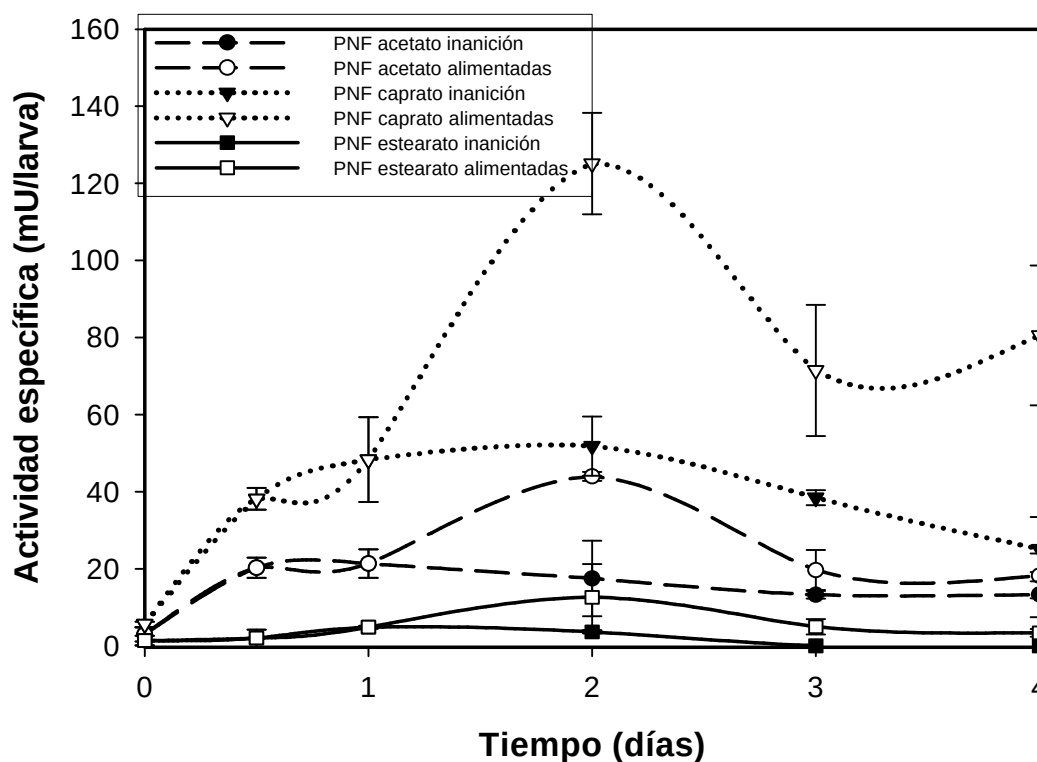


Figura 16. Comparación de la actividad esterasa no específica entre larvas en inanición y alimentadas para los tres sustratos probados.

La actividad de esterasas no específicas utilizando el PNF-acetato, mostró una baja actividad desde el embrión (0 DDE), para después incrementarse ligeramente en el día 2 DDE, disminuir su actividad en el día 3 DDE y mantener constante este valor hasta el día 25 DDE, donde para el día 30 DDE vuelve a incrementar al máximo la actividad (Fig. 17a). Al usar el PNF-caprato se observó un incremento en el día 2 DDE, manteniéndose constante hasta el día 5 DDE. Se detectó otro aumento para el día 7 DDE (siendo este el máximo durante todo el larvicultivo). A

partir del día 9, la actividad decae abruptamente a su nivel mínimo para el día 15 DDE y nuevamente se observa un incremento progresivo desde el día 18 y hasta el día 30 DDE (Fig. 17b). Al utilizar el PNF-estearato, se detectó una gran cantidad de fluctuaciones, siendo este sustrato el que menor actividad mostró de los tres probados. Se detectaron tres picos de máxima actividad los días 2, 7 y 12 DDE. En el día 15 DDE la actividad decayó al mínimo, para volver a incrementarse paulatinamente a partir del día 18 y hasta el día 30 DDE (Fig. 17c).

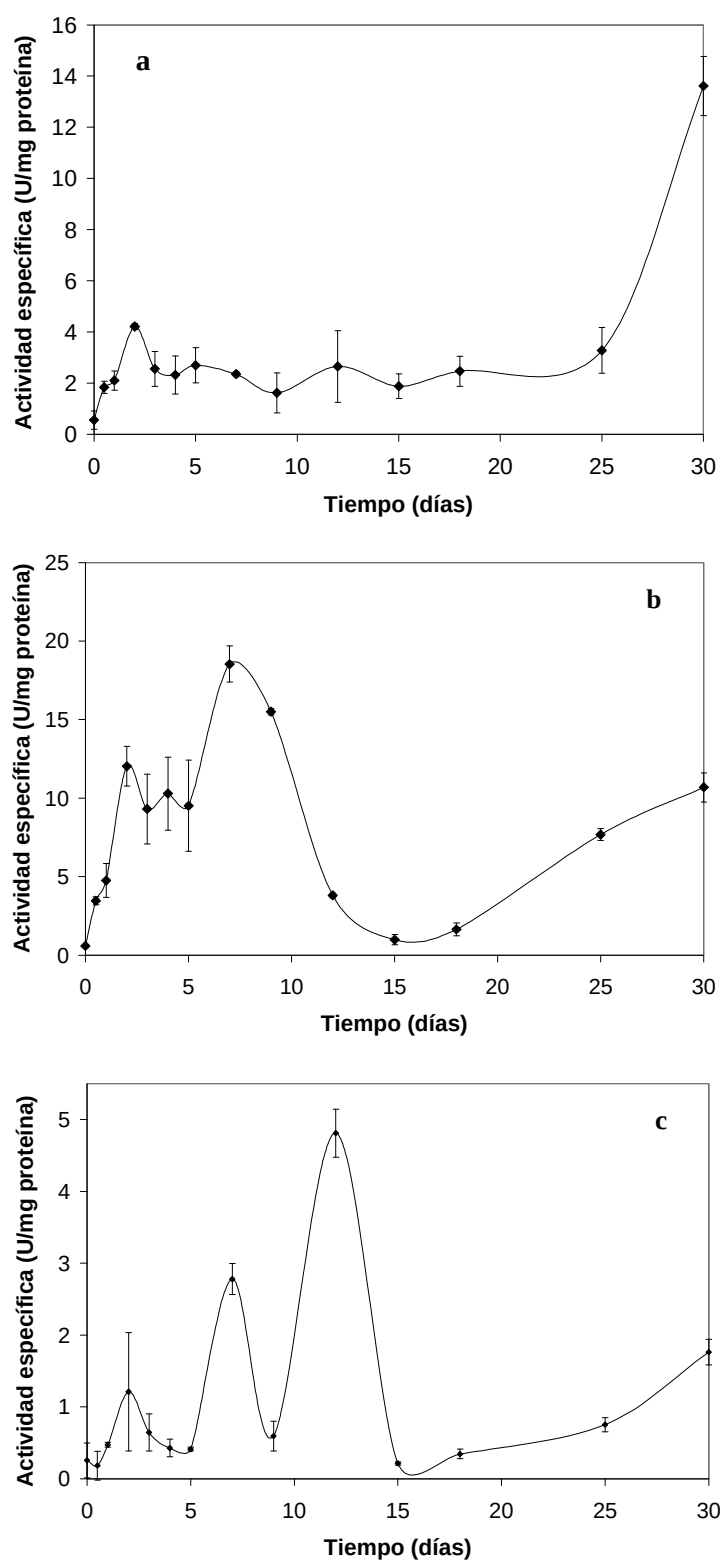


Figura 17. Actividad de esterases no específicas de larvas criadas por 30 días usando tres diferentes sustratos (U/mg de proteína $\pm$ desv. est., $n=3$). a) PNF-acetato, b) PNF-caprato y c) PNF-estearato.

En el caso de la actividad esterasa expresada en mU/larva de las larvas alimentadas, se denotó una tendencia exponencial para todos los valores de actividad desde el inicio de la crianza hasta los 30 DDE para los tres sustratos (2, 10 y 18 carbonos). Sin embargo, se detectaron dos cambios importantes en la actividad específica. El primer que corresponde al inicio de la crianza en los días 3 y 4 DDE, donde se ve una disminución paulatina la cual se recuperó

para el día 5 DDE. A partir de ese momento, se observó un incremento en la actividad hasta el día 9 DDE, donde se detectó el segundo período de disminución en la actividad iniciando el día 12 DDE, para el sustrato de cadena media, y para el día 15 DDE, en el caso de los de cadena larga. Esta disminución de la actividad se mantiene hasta el día 18 DDE, que es cuando se da un incremento exponencial de la actividad hasta el día 30 DDE (Fig. 18).

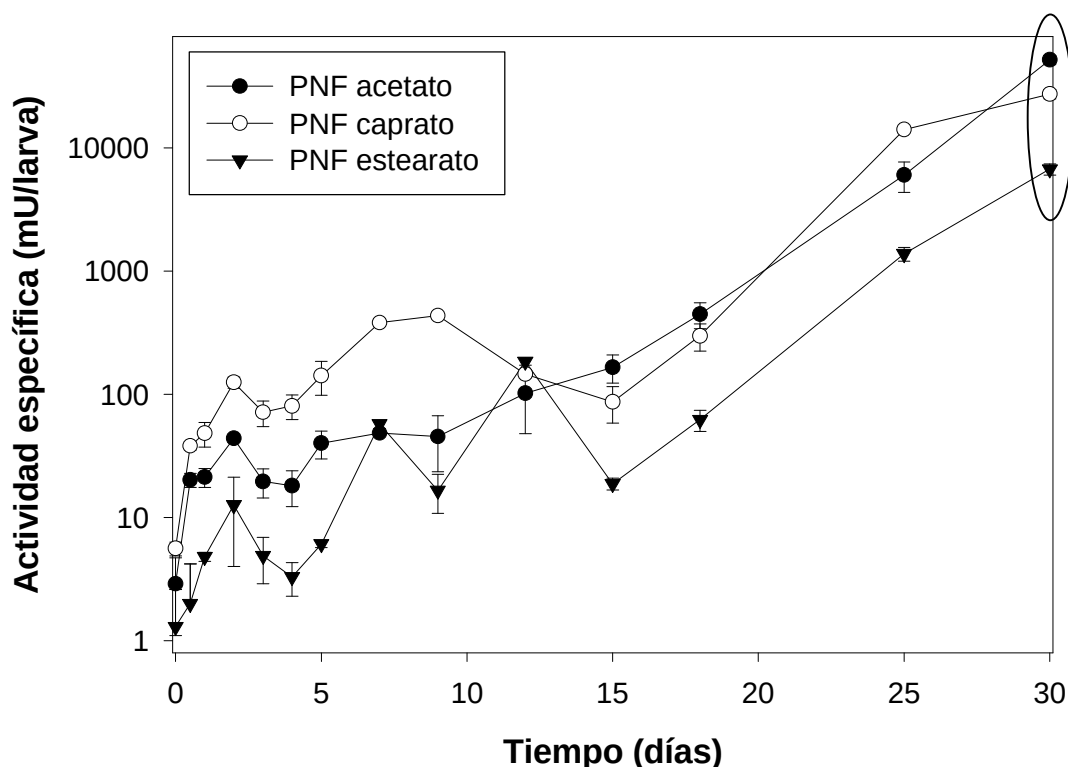


Figura 18. Actividad de esterasas no específicas de larvas criadas por 30 días usando tres diferentes sustratos (PNF: p-nitrofenil-) expresada en mU/larva $\pm$ desv. est. (n=3).

5.3.13. Ontogenia de lipasas usando PAGE.

Para reforzar estos resultados se realizaron zimogramas utilizando β -naftil caprilato a fin de conocer si la actividad lipasa correspondía a una sola enzima o se detectaban diferentes bandas de actividad.

Los zimogramas mostraron diferencias tanto en larvas en inanición (Fig. 19a) como en larvas alimentadas (Fig. 19b), los cuales presentaron

diferentes bandas con capacidad enzimática. Los r_f 's en el zimograma de larvas alimentadas fueron observados a los 0.57 y 0.75, los cuales están por arriba de los detectados para las larvas en inanición (0.53 y 0.68). Las bandas de actividad lipasa de las larvas alimentadas permanecen constantes en los mismos r_f 's; sin embargo, se observaron variaciones en cuanto a la intensidad de dichas bandas a lo largo del período larvario. Cabe resaltar que las

diferencias entre los tiempos de muestreo denotaron dos períodos de baja actividad. El primer periodo para los días 3 y 4 DDE, donde hay un cierto grado de hidrólisis del sustrato, aunque menor comparado con los días subsecuentes. El segundo período

mostró una baja o nula actividad que correspondieron a los 12, 15 y 18 DDE, donde las bandas son prácticamente imperceptibles, volviéndose a distinguir para los 25 y 30 DDE. En el caso del día 30 DDE, se observó el máximo grado de hidrólisis del sustrato.

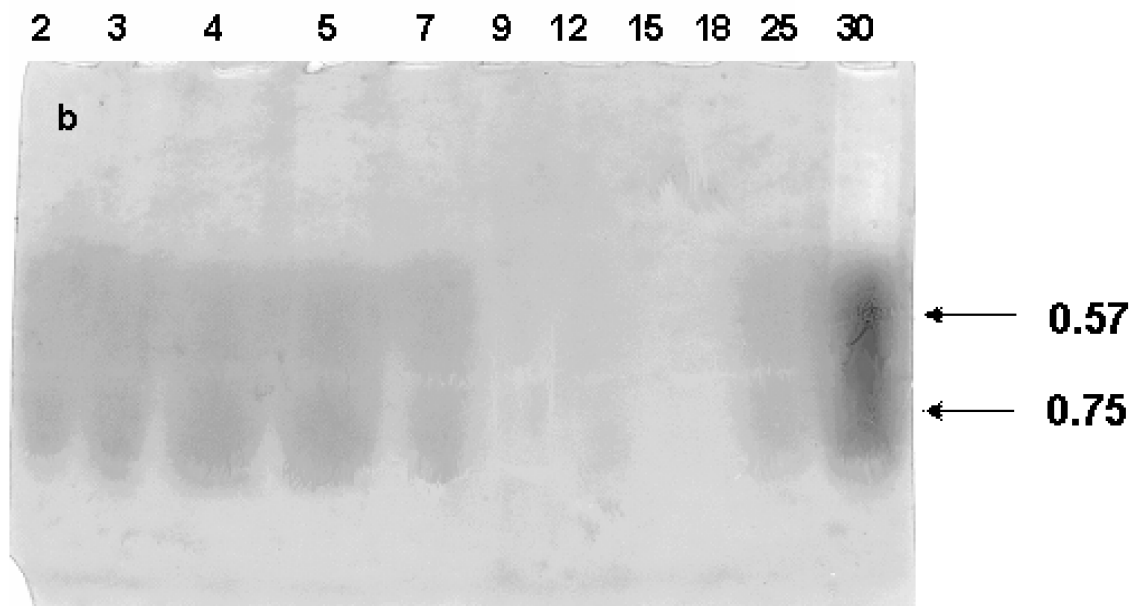


Figura 19. Zimograma en condiciones nativas de la ontogenia de la actividad lipasa. a) inanición; b) alimentada. Los números en la parte superior indican los días después de la eclosión y los números laterales indican los rf's de las bandas de actividad.

5.3.14. Ontogenia de la actividad lipasa.

Se observó un incremento importante en la actividad a partir de la eclosión del eleuteroembrión y hasta el día 4 DDE (alimentación con rotíferos enriquecidos), para mantenerse constante desde el día 4 hasta el día 5 DDE, y alcanzar el máximo de actividad en el día 7 DDE, siguiendo la misma tendencia que lo obtenido al utilizar PNF caprato. Para el día 9 DDE se detectó

una rápida disminución de la actividad hasta el día 18 DDE (inicio de la alimentación con *Artemia* adulta), para incrementar su actividad para el día 25 y 30 DDE (Fig. 20a). Al expresar la actividad en mU/larva, se observó un incremento exponencial desde la eclosión y hasta el día 7 DDE, la actividad se mantuvo constante hasta el día 18 DDE, y después incrementó de manera exponencial para los días 25 y 30 DDE (Fig. 20b).

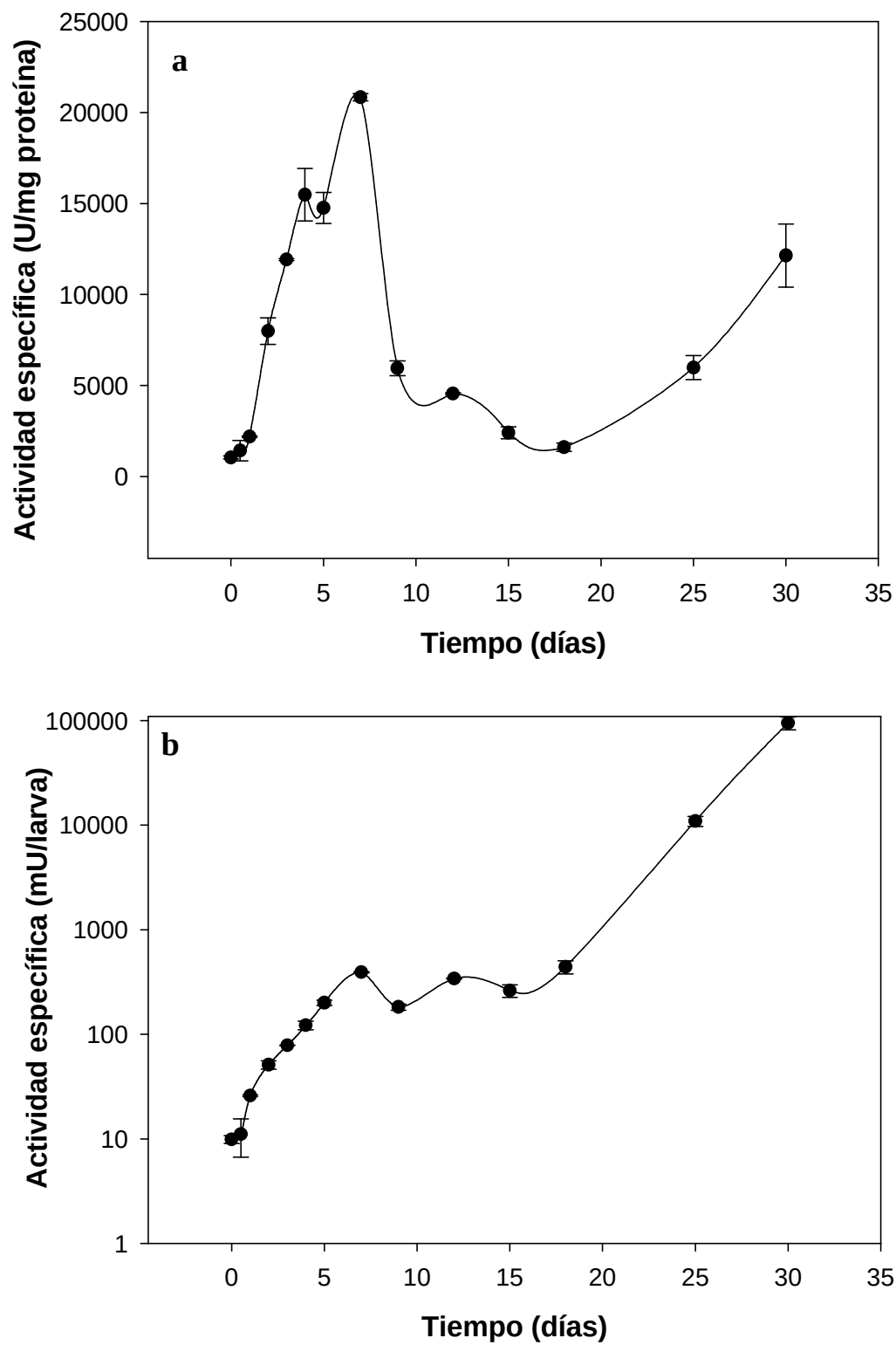


Figura 20. Actividad lipasa durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est.), b) Actividad específica (mU/larva $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.15. Efecto del SDS sobre la actividad y estabilidad de las lipasas.

El efecto del SDS a diferentes concentraciones y tiempos de preincubación mostró que las lipasas de los juveniles de cabrilla son poco estables a las diferentes concentraciones del SDS. A una concentración de 0.06 % de SDS la estabilidad residual decae a un 50 % desde los 30 minutos de preincubación y se mantiene a este nivel

sin importar el tiempo de preincubación. Asimismo, conforme la concentración de SDS aumenta, la actividad lipasa decae fuertemente, ya que a una concentración mayor de 0.13 % la actividad residual alcanza solamente el 10 % desde los 30 minutos de preincubación y se mantiene así sin importar el tiempo de preincubación. A concentraciones mayores de SDS, la actividad residual se mantiene cercana a 0 (Fig. 21).

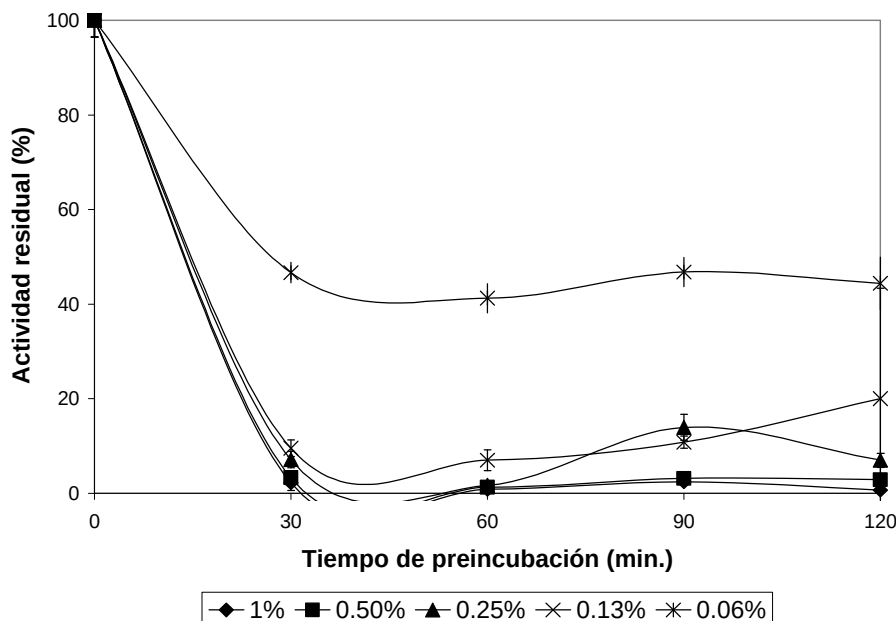


Figura 21. Estabilidad de las lipasas a diferentes concentraciones de SDS y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa (Promedio $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.16. Ontogenia de lipasas usando SDS-PAGE.

Asimismo, se determinó la actividad lipasa por medio de SDS-PAGE en los extractos enzimáticos de las larvas de la cabrilla arenosa. En ambos casos, tanto en larvas en inanición y en larvas alimentadas, se observaron dos bandas con actividad lipolítica. La primera banda de alto peso molecular (~ 60,000 daltons) ubicada en la parte superior del zimograma, y una segunda de mediano peso molecular (~ 40,000 daltons). En el caso de las larvas en inanición, estas bandas aparecen a partir del día 2 DDE (absorción de vitelo) y van

disminuyendo paulatinamente hasta el día 4 DDE (Fig. 22a).

Por otra parte, en el caso de las larvas alimentadas se observaron estas mismas bandas a partir del día 2 DDE, permaneciendo tanto en posición como con actividad relativamente similar. Sin embargo, las bandas de alto peso molecular permanecen durante toda la crianza larvaria (30 DDE), mientras que las de mediano peso molecular solamente se mantienen hasta el día 9 DDE. A partir del día 12 DDE (alimentación con nauplio de Artemia), se notó un cambio en la posición de las bandas, donde las de mediano peso

molecular desaparecen por completo, mientras que aparece una nueva banda de bajo peso molecular ($\sim 30,000$ daltons). Al realizar el zimograma de los alimentos vivos se detectaron una sola banda con baja actividad para los rotíferos ($\sim 45,000$ daltons). Mientras que para la *Artemia* adulta, se observó la

presencia de una sola banda ($\sim 30,000$ daltons), que denota una alta capacidad de hidrolizar lípidos. Al compararla con la de bajo peso molecular presente en las larvas de la cabrilla arenera, se observó en la misma posición que la de la *Artemia* (Fig. 22b).

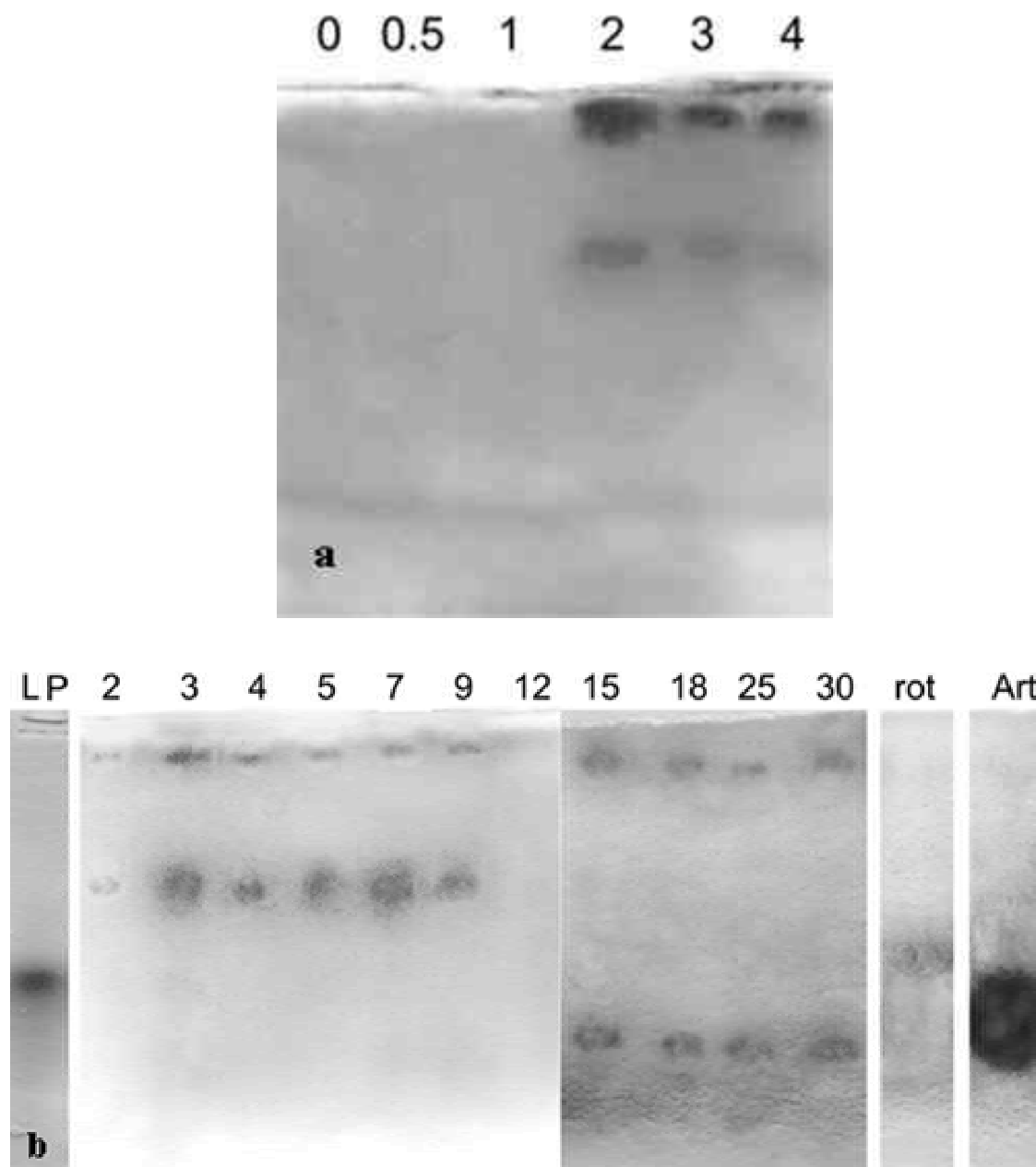


Figura 22. Zimograma en condiciones desnaturizantes de la ontogenia de la actividad lipasa. a) inanición; b) alimentada. Los números superiores indican los DDE. LP: lipasa porcina; rot: rotífero; Art: *Artemia* adulta.

5.3.17. Ontogenia de la actividad amilasa.

En el caso de esta actividad se observó un incremento a partir del día 2 hasta el día 5 DDE, tiempo en el cual empieza una ligera caída de la actividad hasta el día 10 DDE, para nuevamente incrementarse hasta alcanzar su máxima actividad para el día 18 DDE, para volver

a decaer en los días 25 y 30 DDE (Fig 23a). Al analizar los datos transformados a U/larva, se observaron muy bajos niveles de actividad desde el inicio de la crianza y hasta el día 15 DDE. A partir del cual, incrementa de manera exponencial desde el día 18 hasta el día 30 DDE (Fig. 23b).

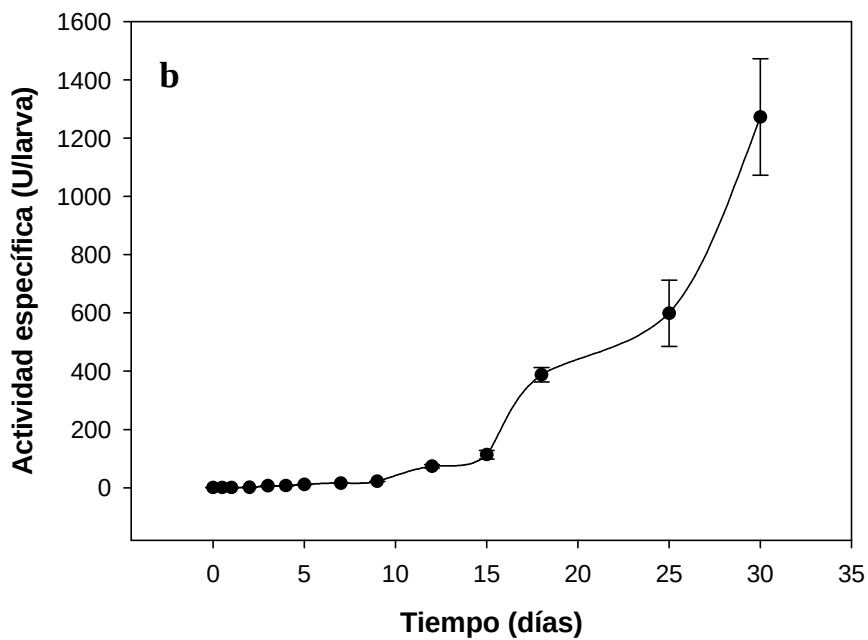


Figura 23. Actividad amilasa durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., $n=3$), b) actividad específica (U/larva $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.18. Ontogenia de la actividad amilasa usando PAGE y SDS-PAGE.

Se realizaron zimogramas para detectar la actividad amilasa tanto en larvas en inanición, como en larvas alimentadas. En el caso de las larvas en inanición, se aplicó exclusivamente la técnica PAGE, y se pudieron poner en evidencia diferentes bandas. Desde la eclosión y hasta el día 1 DDE se observó únicamente una banda (parte superior del zimograma) que desapareció para el día 3 DDE. Por otra parte, en el día 2 DDE se observaron otras dos bandas con actividad amilolítica (parte media e inferior del zimograma), que se mantienen desde este día hasta el día 4,

aunque su actividad fue disminuyendo gradualmente hasta casi desaparecer (Fig. 24a). Para las larvas alimentadas, se aplicó la técnica SDS-PAGE, por lo cual se observaron al menos 4 diferentes bandas con actividad desde el día 2 hasta el día 5 DDE; estas bandas se pueden dividir en dos grupos principales: dos bandas que tienen aproximadamente 100,000 daltons de peso molecular y dos bandas con 80,000 daltons aproximadamente. Todas estas bandas son muy parecidas entre si ya que se encuentran muy cercanas (probablemente isoformas). A partir del día 7 y hasta el final de la crianza, solamente se observaron un par de

bandas en la parte superior del zimograma, las cuales tiene aproximadamente 100,000 daltons, aunque estas bandas no pudieron separarse claramente, por lo que, no es posible asegurar que estas dos bandas sean enzimas diferentes o solamente isoformas. En cuanto a los alimentos vivos, solamente se corrió el zimograma

con los extractos enzimáticos de los rotíferos, detectándose dos bandas con actividad, una de las cuales es similar en peso molecular a las observadas en las larvas de la cabrilla (~ 80,000 daltons); mientras que la segunda banda es de menor peso molecular (~ 60,000 daltons), la cual no corresponde a las observadas en las larvas. (Fig. 24b).

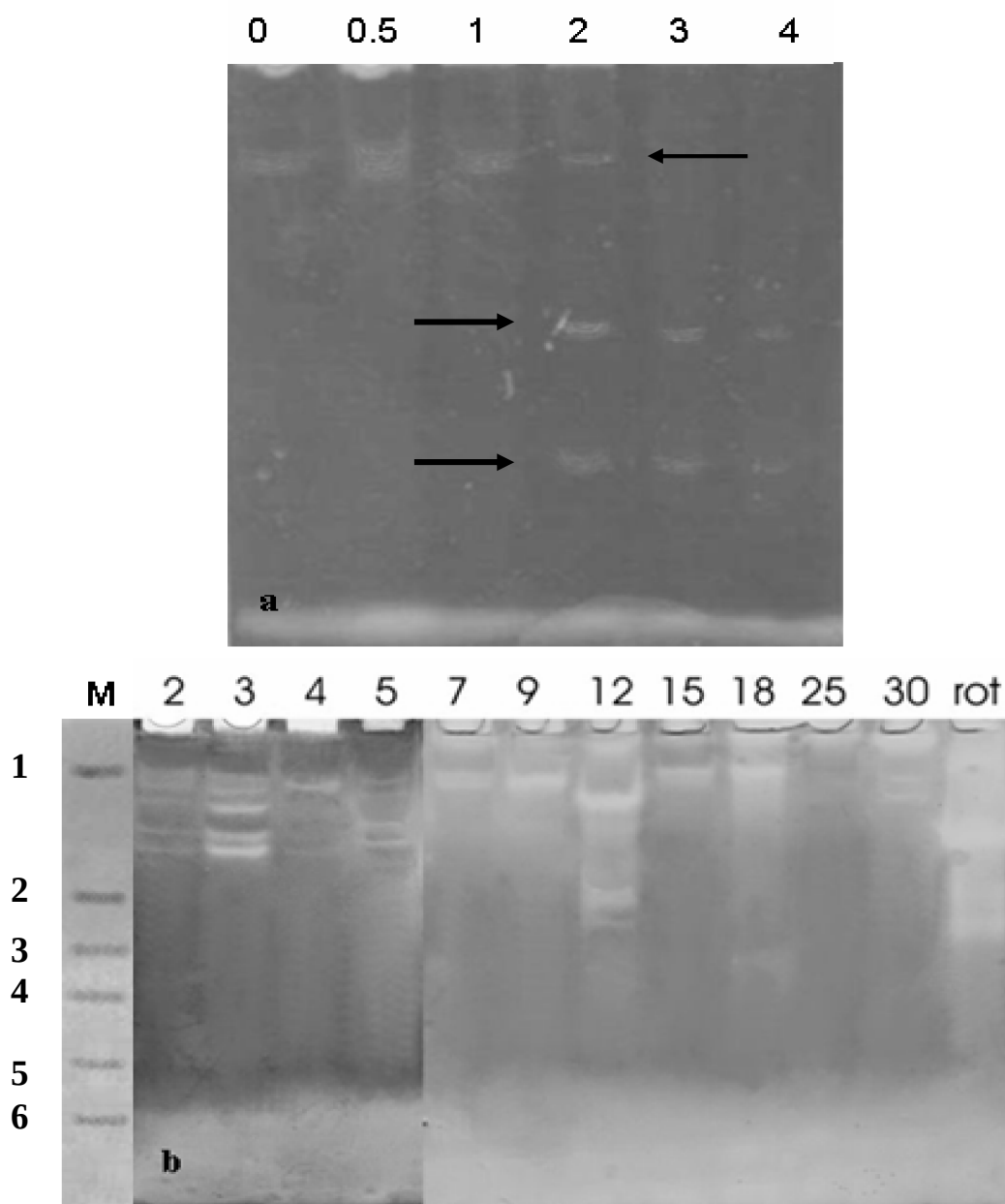


Figura 24. Zimograma de la ontogenia de la actividad amilasa de la cabrilla arenera. a) PAGE de larvas en inanición; b) SDS-PAGE de larvas alimentadas. rot: rotífero. Los números superiores indican los días después de la eclosión. Los números laterales indican los pesos moleculares (Kilodaltons); 1) fosforilasa *b* (94), 2) albúmina bovina (67), 3) albúmina de huevo (43), 4) anhidraza carbónica (30), 5) tripsinógeno (24) y 6) inhibidor de tripsina de soya (20).

5.3.19. Ontogenia de las actividades fosfatasa alcalina y ácida.

La actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas, fueron muy parecidas, aunque con dos diferencias marcadas. La primera, que corresponde a los primeros días de vida de las larvas, ya que se detectó que la actividad de las fosfatasas ácidas es mayor a la de las fosfatasas alcalinas, desde el inicio de la eclosión y hasta el día 3 DDE. A partir del día 4 y hasta el día 7 DDE, hubo una caída en la actividad de ambos tipos de fosfatasas, para luego incrementarse rápidamente para el 12 DDE, siendo este el día con mayor actividad para ambos tipos de enzimas. Sin embargo, en este día se observó la segunda diferencia, ya que la actividad de la fosfatasa alcalina fue mucho mayor que la actividad de las fosfatasas ácidas. Para el día 15 DDE, vuelve a decaer la actividad de ambas enzimas y se mantiene a niveles bajos a partir del día 18 y hasta el día 30 DDE (Fig. 25a).

Al realizar la transformación a mU/larva, se observó un comportamiento similar al descrito anteriormente, salvo que a partir del día 18 DDE vuelve a incrementarse la actividad de ambas enzimas de manera exponencial y se

mantiene de esta forma hasta el final del período larvario (Fig. 25b).

5.3.20. Comparación de actividades enzimáticas entre larvas en inanición y alimentadas.

Al realizar la comparación de todas las actividades enzimáticas en larvas alimentadas y en inanición durante los días 2, 3 y 4 DDE (Tabla 7), se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la mayoría de las actividades a partir del día 2 DDE, como es el caso de la lipasa, amilasa (solo en U/mg prot.), tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa (solo en mUx10⁻³/mg prot.) y fosfatasa ácida (solo en mU/mg prot.). Mientras que para las actividades de proteasa alcalina, amilasa (en mU/larva), leucina aminopeptidada (en mUx10⁻³/larva) y fosfatasa alcalina, las diferencias significativas se detectan hasta el día 3 DDE. De forma diferente, para la fosfatasa ácida expresada en mU/larva, no se detectaron diferencias significativas entre las larvas en inanición y alimentadas. Se debe mencionar que las mayores actividades fueron obtenidas en las larvas alimentadas.

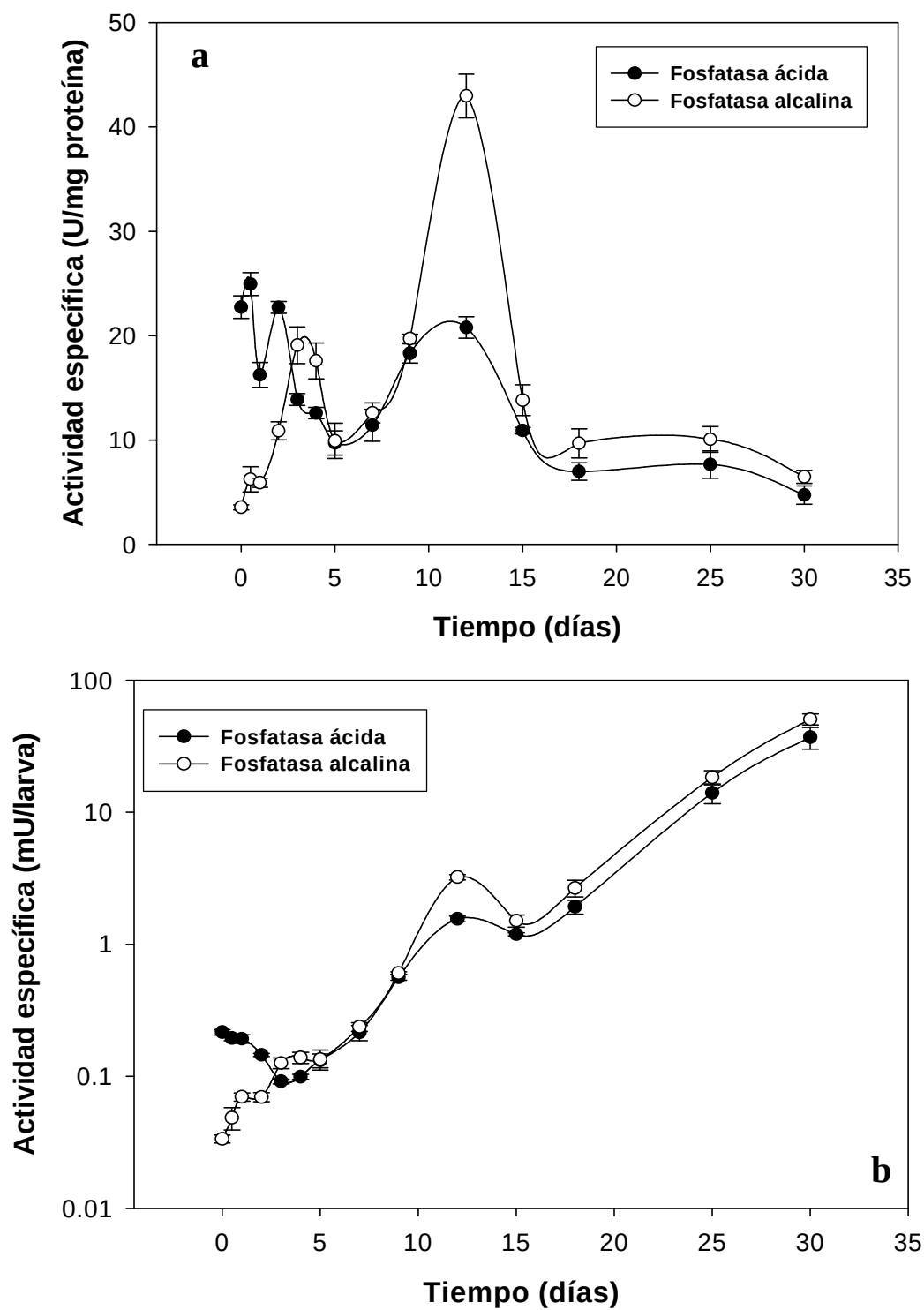


Figura 25. Actividades fosfatasa ácida y alcalina durante el larvicultivo de la cabrilla arenosa. a) Actividad específica (U/mg proteína $\pm$ desv. est., $n=3$), b) Actividad específica (mU/larva $\pm$ desv. est., $n=3$).

Tabla 7. Actividad enzimática de huevos y larvas (en inanición y alimentadas) de la cabrilla arenera hasta el día 4 después de la eclosión.

DDE	huevo		1		2*		3		4	
			Vitelo	Inanición	Alimentada	Inanición	Alimentada	Inanición	Alimentada	
Proteasa alcalina										
U/mg prot	1.6	1.1	2.1	2.0	2.4b	14.1a	2.9b	16.4a		
mU/larva	15.2	12.7	17.8	12.7	14.9b	93.0a	12.6b	129.5a		
Lipasa										
U/mg prot	1040.9	2182.7	4106.1b	7986.7a	7835.1b	11911.7a	4621.7b	15478.1a		
U/larva	9.9	25.9	34.5b	51.1a	48.7b	78.5a	20.0b	122.0a		
Amilasa										
U/mg prot	59.0	45.0	155.1b	195.5a	316.70b	970.7a	236.8b	882.0a		
mU/larva	0.6	0.5	1.3	1.3	1.97b	6.4a	1.0b	7.0a		
Tripsina										
mU x 10 ⁻³ /mg prot	0.5	0.8	0.4b	0.6a	0.4b	1.3a	0.5b	1.2a		
mU x 10 ⁻³ /larva	0.00	0.00	0.00b	0.01a	0.00b	0.01a	0.00b	0.01a		
Quimotripsina										
mU x 10 ⁻³ /mg prot	133.5	143.2	73.6b	123.0a	100.8b	324.9a	76.5b	251.7a		
mU x 10 ⁻³ /larva	1.3	1.1	0.6b	0.7a	0.6b	2.3a	0.4b	2.7a		
Leucina aminopeptidasa										
mU x 10 ⁻³ /mg prot	1.1	1.3	1.9b	2.5a	3.6b	10.0a	2.7b	8.8a		
mU x 10 ⁻³ /larva	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0b	0.1a	0.0b	0.1a		
Fosfatasa alcalina										
mU/mg prot	3.5	5.9	7.6	10.9	8.0b	19.1a	8.5b	17.6a		
mU/larva	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0b	0.1a	0.0b	0.1a		
Fosfatasa ácida										
mU/mg prot	22.7	16.2	14.7b	22.7a	11.0b	13.9a	12.7	12.6		
mU/larva	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		

Los superíndices diferentes representan diferencias significativas (P<0.05) entre larvas en inanición y larvas alimentadas únicamente para los días 2, 3 y 4. * Apertura de boca.

5.3.21. Actividades enzimáticas de los alimentos vivos.

Los alimentos vivos presentaron las mismas actividades enzimáticas que las larvas de la cabrilla arenera, aunque con actividades diferentes entre las

presas (Tabla 8). En el caso de las proteasas alcalinas, amilasa, tripsina y leucina aminopeptidasa, las mayores actividades fueron observadas en orden decreciente, de la siguiente manera: Artemia adulta, rotíferos enriquecidos,

rotíferos sin enriquecer y nauplios de Artemia. Al comparar la proteasa ácida y fosfatasa ácida, los rotíferos enriquecidos y sin enriquecer mostraron las mayores actividades, seguidos de los adultos de Artemia y los nauplios de Artemia. Para las lipasas, la mayor actividad fue detectada en la Artemia

adulto los rotíferos sin enriquecer y enriquecidos, y por último los nauplios de Artemia. La mayor actividad quimotripsina se detectó para los rotíferos sin enriquecer, seguido de la Artemia adulta, después de los nauplios de Artemia y al último los rotíferos enriquecidos.

Tabla 8. Actividades enzimáticas de los alimentos vivos utilizados para el larvicultivo de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est.).

Actividades	rotíferos sin enriquecer	rotíferos enriquecidos	nauplios de Artemia	adultos de Artemia
Proteasa alcalina (U/mg prot)	3.1 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3	23.4 $\pm$ 0.7
Proteasa ácida (U/mg prot)	4.2 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.4
Lipasa (U/mg prot)	6736.7 $\pm$ 669.6	5666.2 $\pm$ 404.7	420.3 $\pm$ 33.1	13397.2 $\pm$ 675.6
Amilasa (U/mg prot)	645.1 $\pm$ 34.9	774.1 $\pm$ 47.0	49.4 $\pm$ 11.9	1442.4 $\pm$ 94.2
Fosfatasa ácida (mU/mg prot)	13.0 $\pm$ 0.3	21.5 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 1.2
Fosfatasa alcalina (mU/mg prot)	10.2 $\pm$ 1.0	11.3 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 2.3
Tripsina (mU $\times$ 10⁻³/mg prot)	1.2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.6
Quimotripsina (mU $\times$ 10⁻³/mg prot)	265.1 $\pm$ 33.1	114.0 $\pm$ 10.6	172.3 $\pm$ 17.5	201.2 $\pm$ 7.0
Leucina aminopeptidasa (mU $\times$ 10⁻³/mg prot)	34.6 $\pm$ 2.0	35.7 $\pm$ 2.1	7.1 $\pm$ 2.1	44.7 $\pm$ 3.5

5.3.22. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas.

Estos estudios están encaminados a determinar los diferentes parámetros operacionales que dictan los niveles óptimos de actividad y estabilidad de los extractos multienzimáticos de las larvas de la cabrilla arenosa. El nivel óptimo de pH de las proteasas alcalinas mostró dos diferentes intervalos de máxima actividad. Entre los pH's de 2 y

5, se detectaron bajos niveles de actividad que aumentaron gradualmente hasta alcanzar un primer intervalo de máxima actividad que se dio entre los pH's de 6 a 8, para después sufrir una caída a pH 9 y volver a aumentar su actividad hasta alcanzar un segundo pico de máxima actividad a pH 10; después de este valor la actividad decae a casi cero (Fig. 26).

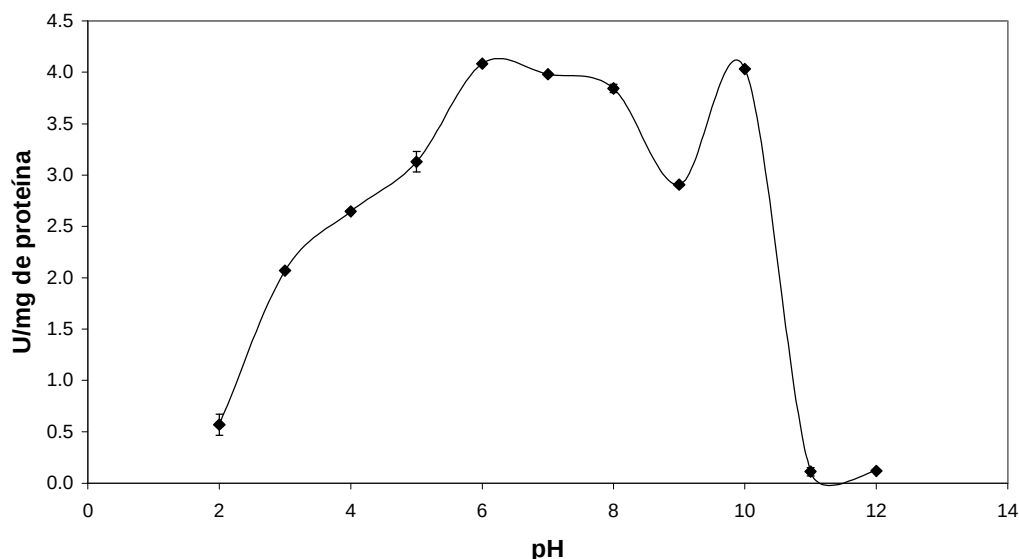


Figura 26. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas alcalinas de los juveniles (45 DDE) de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.23. Efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas alcalinas.

Para probar la estabilidad de las proteasas alcalinas, los extractos fueron sometidos a diferentes tiempos de preincubación a diferentes pH's y después se evaluó su actividad residual bajo las condiciones estándar. Las proteasas alcalinas mostraron una alta estabilidad a los pH's de 5, 7, 9 y 12, donde su actividad relativa se mantiene

por encima del 75 % para todos estos pH's., incluso llegando a superar el 100% como sucedió a pH 7, donde aumentó la actividad por encima de 100 % a los 60 minutos, ó como a pH 12 donde aumentó la actividad residual por arriba de 100 % a los 90 minutos. Sin embargo, para el pH de 2 la estabilidad de las proteasas decae en un 50 % a los 30 minutos de preincubación y en un 90 % a los 60 minutos (Fig. 27).

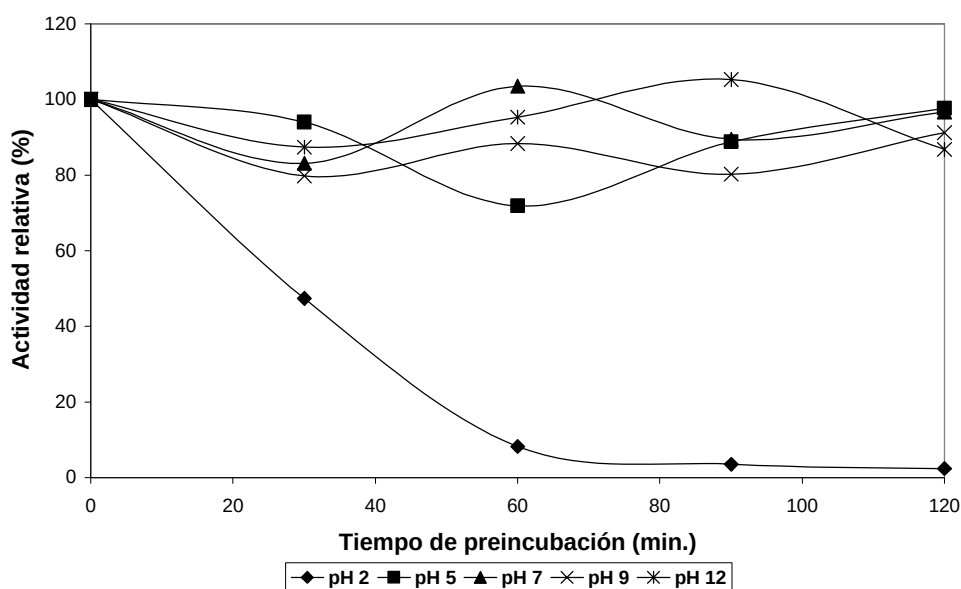


Figura 27. Estabilidad de proteasas alcalinas a diferentes pH's y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa.

5.3.24. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas.

La temperatura óptima encontrada para las proteasas alcalinas

se detectó a los 55 °C alcanzando el nivel máximo de actividad con 2 U/mg de proteína (Fig. 28).

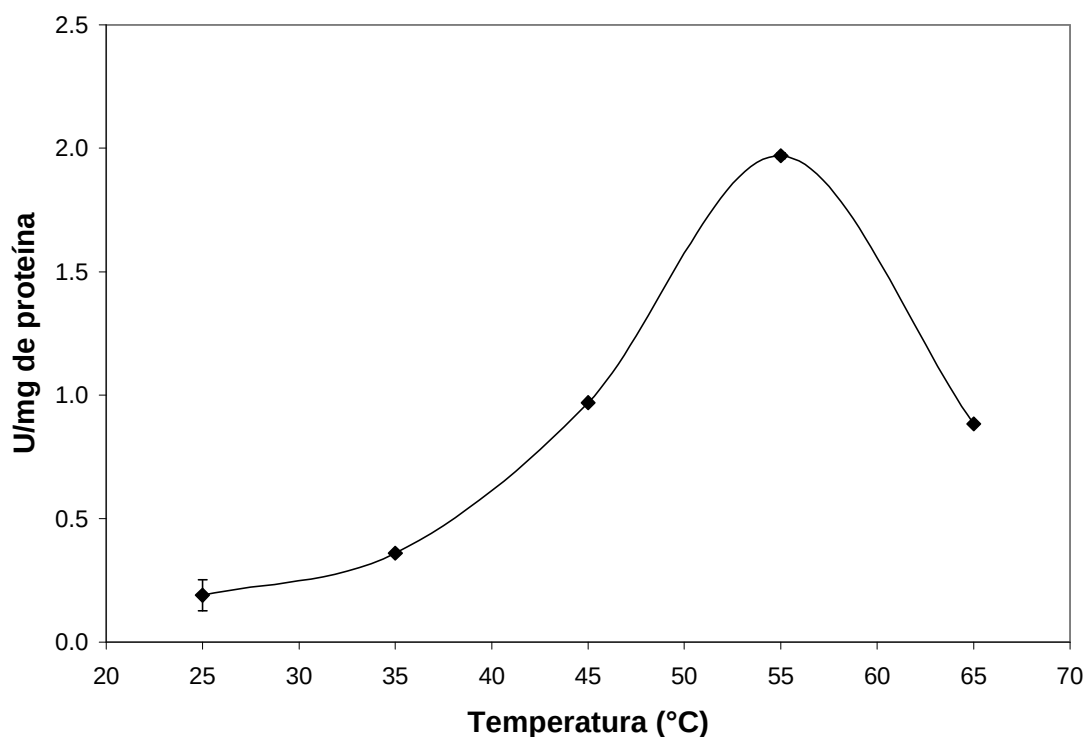


Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas alcalinas de los juveniles de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.25. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas alcalinas.

Los estudios de estabilidad a diferentes tiempos y temperaturas de preincubación mostraron que las proteasas alcalinas son poco estables a 65 °C, aún desde tiempos de preincubación cortos (30 min.). Sin embargo a temperaturas de 45 y 55 °C, se observaron altas estabilidades logrando inclusive aumentar sus

actividades relativas hasta unos 160 % (con 90 minutos de preincubación), comparados con el control sin preincubar. Este estudio demostró que las proteasas alcalinas aumentaron su actividad conforme se mantuvieron a mayor tiempo de preincubación para ambas temperaturas, aunque en la mayoría de los tiempos la temperatura de 55 °C fue la que mostró la mayor actividad (Fig. 29).

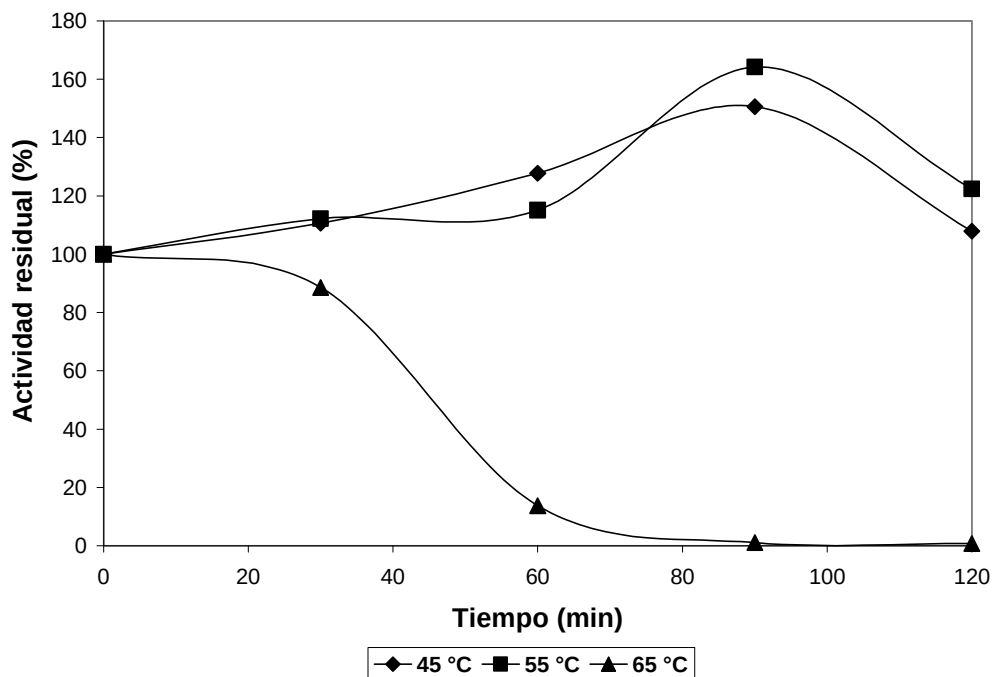


Figura 29. Estabilidad de proteasas alcalinas a diferentes temperaturas y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenosa.

5.3.26. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas ácidas.

Las proteasas ácidas tuvieron su pH óptimo en 2, obteniendo un nivel de actividad máxima de 38 U/mg de

proteína y disminuyendo gradualmente a 21 U/mg de proteína a pH de 3; a 5 U/mg de proteína a pH 4 y 5 y desaparecer totalmente la actividad a pH 6 y 7 (Fig. 30).

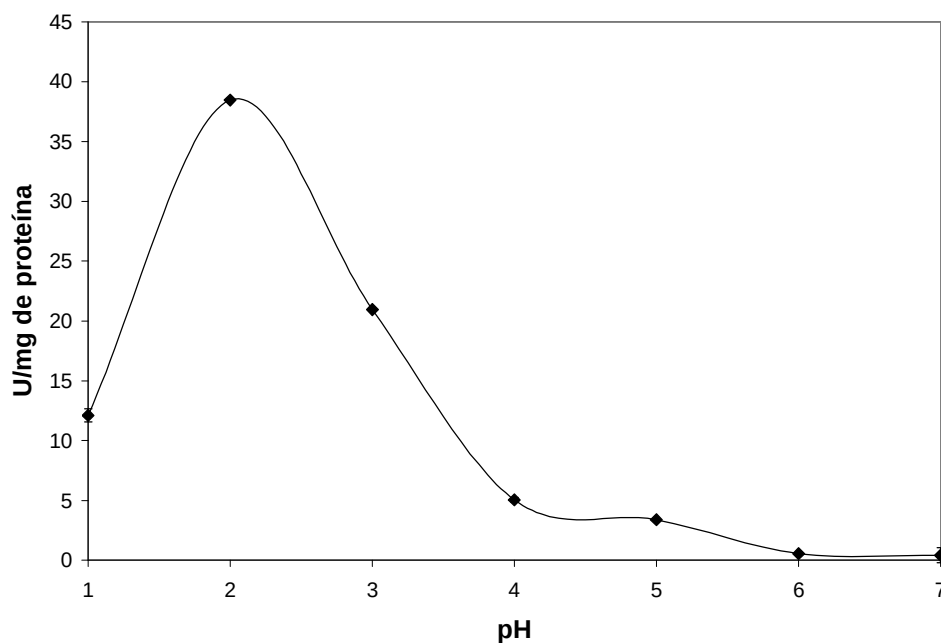


Figura 30. Efecto del pH sobre la actividad de proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenosa (promedio $\pm$ desv. est., $n=3$).

5.3.27. Efecto del pH sobre la estabilidad de proteasas ácidas.

De la misma manera que con las proteasas alcalinas, la estabilidad de las proteasas ácidas a diferentes pH's y tiempos de preincubación mostraron alta

estabilidad a los diferentes pH's, perdiendo solamente un 12 % de la actividad relativa a pH de 2, 5, 7 y 9. Mientras que a pH 12, se pierde un 40 % de actividad residual a partir de los 30 minutos de preincubación (Fig. 31).

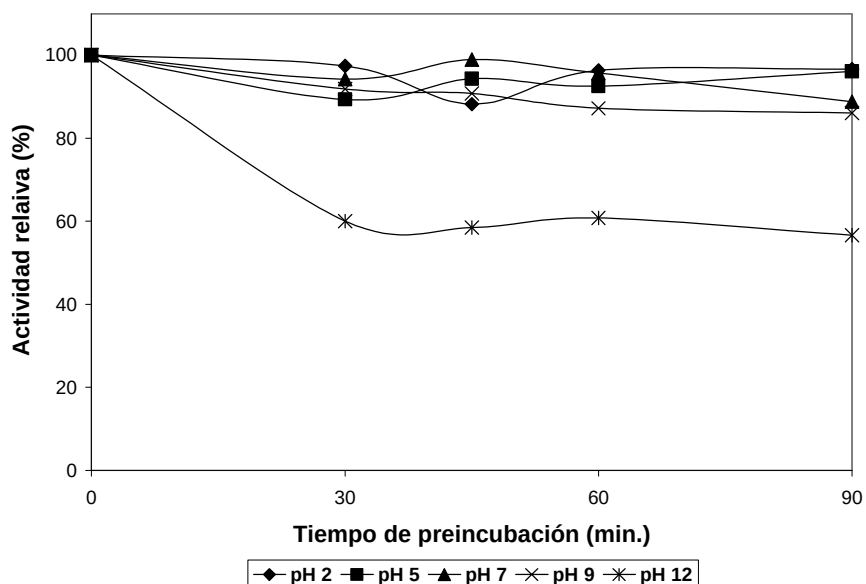


Figura 31. Estabilidad de proteasas ácidas a diferentes pH's y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenera.

5.3.28. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas ácidas.

La temperatura óptima para las proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenera se detectó a los 45 °C,

con una actividad máxima de 43 U/mg de proteína y disminuyendo a 40 U/mg de proteína a los 55 °C y a 5 U/mg de proteína a los 65 °C (Fig. 32).

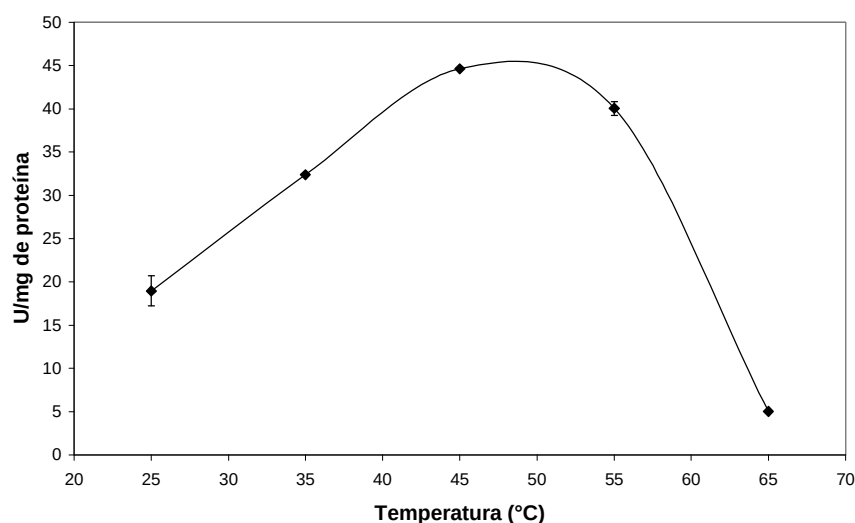


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenera (promedio $\pm$ desv. est., n=3).

5.3.29. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de proteasas ácidas.

La estabilidad de las proteasas ácidas a diferentes temperaturas y tiempos de preincubación, demostraron que en general, solamente a los 45 °C, la actividad relativa de las proteasas ácidas se mantiene estable sin importar los tiempos de preincubación. Sin embargo a 55 °C la actividad de las proteasas

ácidas disminuye a 40 % con 30 minutos de preincubación de los extractos y decae a 30 % de actividad a los 60 minutos de preincubación para mantenerse sin cambios a tiempos de preincubación posteriores. A 65 °C se observó que desde los 30 minutos de preincubación la actividad residual cae totalmente sin que se vuelva a recuperar (Fig. 33).

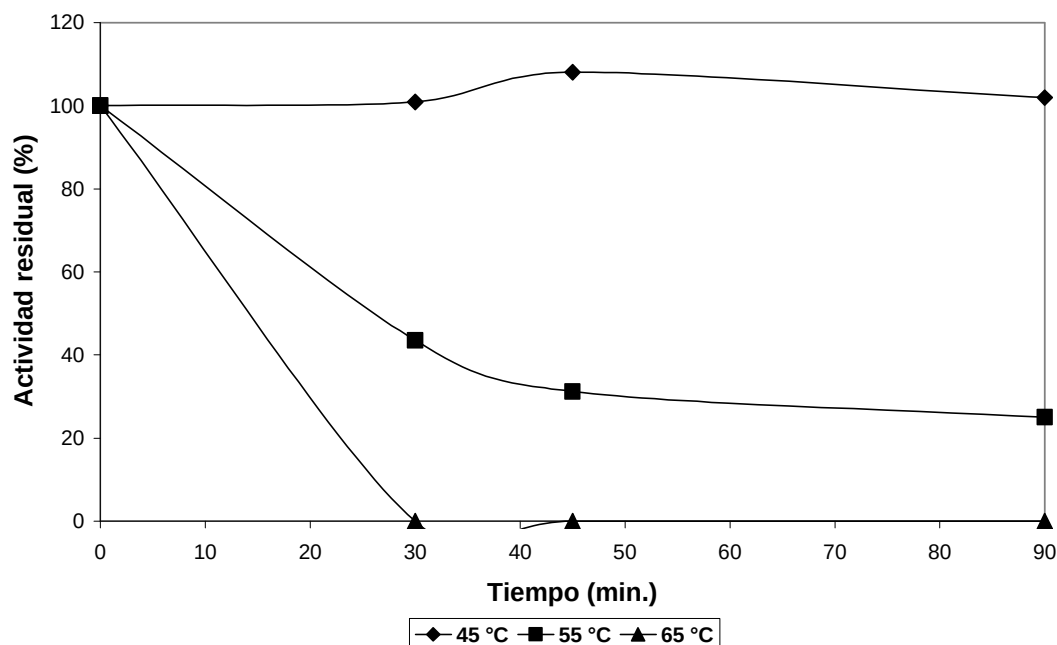


Figura 33. Estabilidad de proteasas ácidas a diferentes temperaturas y tiempos de preincubación de los extractos enzimáticos de juveniles de la cabrilla arenera.

5.3.30. Efecto de Inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas y ácidas.

La caracterización de las proteasas presentes en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (Fig. 34), mostraron una alta resistencia a los diferentes inhibidores utilizados y en comparación a las proteasas comerciales que se utilizaron como control. La actividad tripsina se inhibió en un 20 % al utilizar PMSF y TLCK. La actividad

quimotripsina fue inhibida en un 20 % al utilizar SBT1 y en un 18 % al utilizar ZPCK. Mientras que la actividad de metal proteasas se inhibió en un 35 y 40 % al utilizar EDTA y EGTA respectivamente. El ovomucoide de huevo inhibió solamente en un 5 % la actividad de las proteasas de los juveniles de la cabrilla arenera en comparación con los controles. En contraste, la actividad de proteasas ácidas fue inhibida en un 95 % al utilizar pepstatin A.

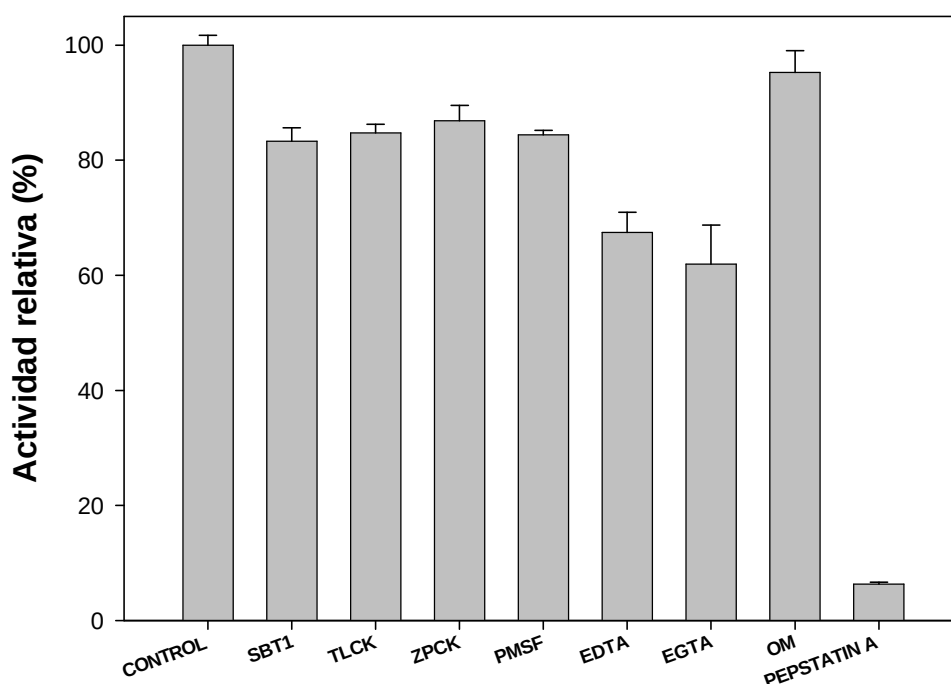


Figura 34. Estudio de Inhibición de las proteasas alcalinas, metal proteasas y proteasas ácidas presentes en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera.

Por otra parte, los inhibidores específicos fueron muy efectivos al utilizarlos con proteasas alcalinas y ácidas comerciales, logrando inhibir en

más del 80 y hasta el 100 % la actividad residual de este tipo de enzimas (Fig. 35).

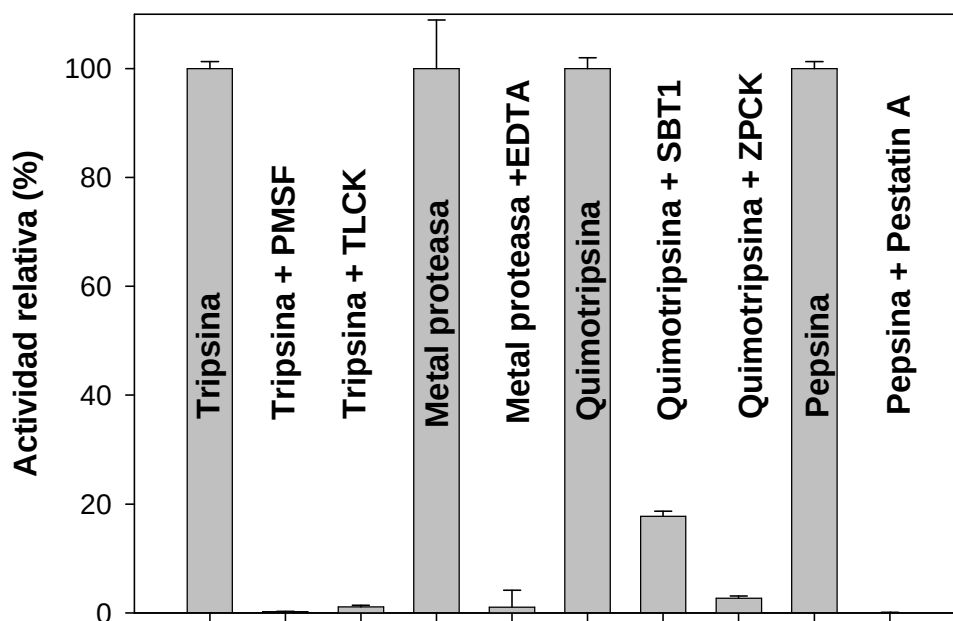


Figura 35. Estudio de Inhibición de las proteasas alcalinas, metal proteasas y proteasas ácidas de bovino (1 mg/ml).

5.3.31. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteasa alcalina y ácida usando técnicas electroforéticas.

La caracterización por medio de inhibidores mostró que en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera, la presencia de 4 bandas con actividad proteolítica, de las cuales al utilizar el PMSF, TLCK y ZPCK dejó de aparecer la 4ª banda. Al utilizar el SBT1, disminuyó la actividad de la banda 2 y desaparecieron las bandas 3 y 4. El EDTA, disminuyó grandemente la actividad de la banda 1 y eliminó las bandas 2, 3 y 4, lo que corresponde a lo

observado en los ensayos in vitro, donde el EDTA es la que mostró la mayor capacidad inhibitoria comparado con los otros compuestos. Finalmente, el ovomucoide de huevo, aparentemente eliminó todas las bandas de actividad proteolítica, lo cual no concuerda con lo observado en los ensayos in vitro, ya que fue la sustancia que menor efecto inhibitorio mostró (Fig. 36).

El zimograma de proteasa ácida mostró una inhibición total de este tipo de enzimas al utilizar el pepstatin A, de la misma manera que en la pepsina porcina corrida al mismo tiempo (Fig. 37).

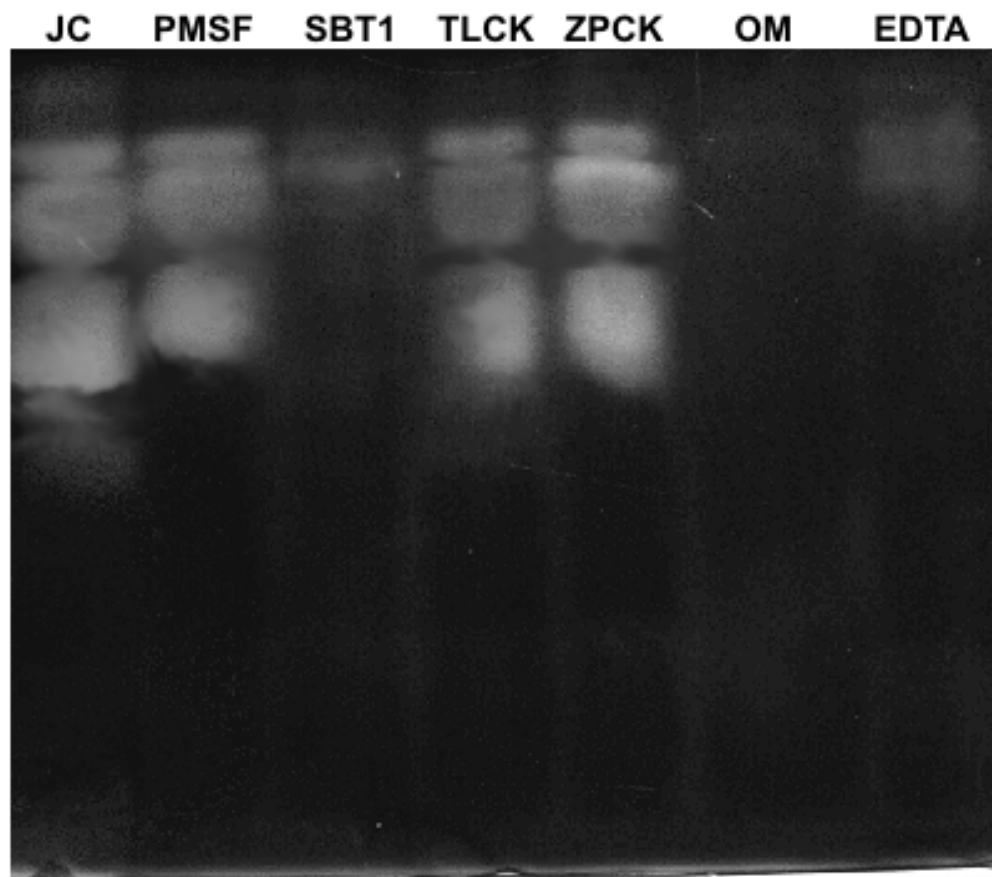


Figura 36. Estudio electroforético de inhibición de las proteasas alcalinas presentes en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera. JC: juvenil de cabrilla, las otras siglas corresponden a los nombre abreviados de los inhibidores.

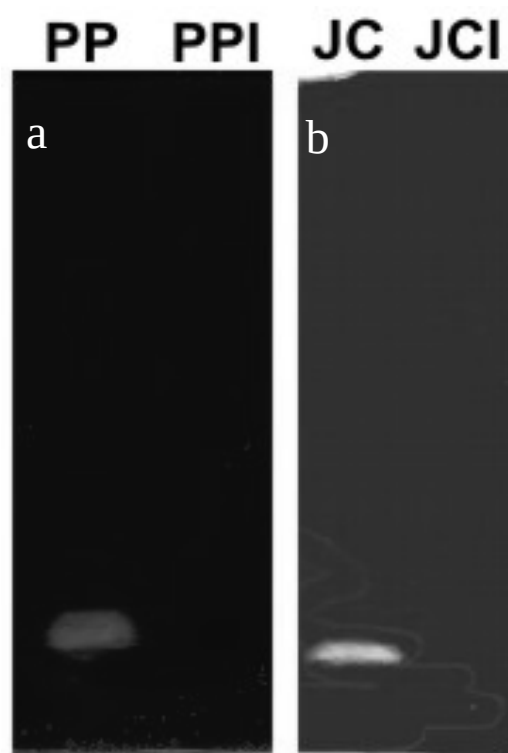


Figura 37. Estudio electroforético de Inhibición de a) pepsina porcina (1 mg/ml) y b) pepsina presente en los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera. PP: pepsina porcina; PPI: pepsina porcina + inhibidor; JC: juvenil de cabrilla; JCI: juvenil de cabrilla + inhibidor.

5.4. DISCUSIÓN.

5.4.1. Ontogenia enzimática.

Uno de los grandes retos de la acuicultura marina es la cría masiva de larvas, paso indispensable para lograr el cultivo comercial de cualquier especie. Por lo que en la actualidad, los esfuerzos de investigación se han encaminado a determinar las condiciones óptimas, tanto ambientales como inherentes a las larvas, que permitan incrementar su crecimiento y supervivencia. A través de estudios de fisiología de la nutrición en los períodos tempranos de vida, se ha podido entender la evolución de las enzimas digestivas, por lo que se ha logrado la planificación de las pautas de alimentación y capacidades nutricionales de las larvas de peces marinos (Díaz-López *et al.* 1997).

Es por esto, que actualmente los estudios se basan en el conocimiento detallado de actividades enzimáticas digestivas de proteasas, lipasas, amilasas, fosfatasas, entre muchas otras a lo largo de su ontogenia temprana. Por lo anterior, es de suma importancia tal conocimiento, ya que puede servir como un buen indicador del estado nutricional de la larva, de manera tal que los datos obtenidos pueden ser relevantes para establecer el momento en el que la larva cuenta con la maquinaria enzimática que le permita digerir de forma eficiente el alimento, y por consecuencia determinar el momento óptimo para realizar la deshabitación hacia las presas vivas (destete) con dietas inertes adecuadas a este período de desarrollo (Ueberschär, 1993; Alarcón y Martínez, 1998).

5.4.1.1. Proteasas.

La presencia de las proteasas alcalinas en las larvas de cabrilla arenosa fue detectada a partir del día 2 DDE, lo que se da antes que lo observado en especies como la dorada y la lubina (Moyano *et al.*, 1996; Zambonino-Infante y Cahu, 1994a; Zambonino-Infante *et al.*, 1996) por medio de técnicas *in vitro*. En

concordancia con la aparición temprana de enzimas digestivas, al momento de la eclosión el páncreas de muchas de las larvas está bien desarrollado y sus células acinares son funcionales, ya que han sido observados zimógenos granulares que se piensa son los precursores de la actividad tripsina y quimotripsina (O'Connell, 1976; Govoni, 1980). Estos zimógenos granulares han sido observados para las larvas de la cabrilla arenosa a partir del día 2 DDE (Peña-Martínez *et al.*, 2003), mientras que para las larvas de tilapia *Oreochromis niloticus*, la presencia de los zimógenos se ha observado desde la eclosión, por lo que estos autores mencionan que la tilapia tiene la capacidad de digerir cualquier tipo de dieta en el momento de la apertura de la boca (Tengjaroenkul *et al.*, 2002). Esta misma capacidad ha sido estudiada a través de técnicas moleculares en larvas del lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* donde se detectó la expresión de precursores de enzimas pancreáticas y se estimó la digestibilidad de proteínas a través de técnicas electroforéticas. Los resultados mostraron que las larvas expresan todas las enzimas pancreáticas desde el momento de la eclosión, y por lo tanto, tienen una alta capacidad de digerir proteínas, mismo que se comprobó al observarse una rápida degradación de los sustratos proteínicos probados (Srivastava *et al.*, 2002).

Por otra parte, se observaron una serie de fluctuaciones en la actividad de proteasas alcalinas a lo largo del cultivo larvario de la cabrilla arenosa, como ha sido previamente reportado para especies como el barramundi, la dorada, la lubina y el sargo, donde en los primeros días de vida (2-12 DDE) se incrementa fuertemente la actividad, para después disminuir (15-25 DDE), y luego mantenerse estable (Waldford y Lam, 1993; Alarcón, 1997; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Cara *et al.*, 2002). Estas fluctuaciones aparentemente están fuertemente relacionadas con tres

aspectos: 1) con procesos genéticos, en especial al observarse cierta actividad específica en larvas en inanición durante la absorción del vitelo (por ejemplo, hidrólisis de fosfolípidos); 2) como una respuesta a la ingesta (comportamiento alimenticio), en el momento de agregar los alimentos vivos (rotíferos y *Artemia*), y 3) por la desaparición progresiva de la función metabólica en la cual está implicada una determinada enzima (lactasa en el caso de los mamíferos), o por un relativo incremento del pool de proteína soluble en el organismo. Esta última posibilidad es más frecuente en larvas en fase de crecimiento, debido a que su fracción tisular se vuelve paulatinamente más importante, y por lo tanto, el contenido corporal en proteína soluble va aumentando progresivamente (Cara *et al.*, 2002).

Para las larvas de cabrilla arenera, se detectó un aumento importante en esta actividad al realizar el cambio al segundo alimento para el día 12 DDE (nauplios de *Artemia*), lo cual corresponde a lo mencionado por Moyano *et al.* (1996) para larvas de dorada, ya que se considera como una respuesta abrupta a la diferencia nutricional entre el primer y segundo alimento. Al realizar el tercer cambio de alimento (adultos de *Artemia*) se observó una caída de la actividad de proteasas alcalinas, lo que se ha relacionado con la composición química de la presa, al ser muy diferente a los alimentos anteriores (Collins y Anderson, 1997; Cahu y Zambonino-Infante, 2001), pudiendo ser un proceso de adaptación al observarse un incremento en la actividad para los días posteriores, aunque en menor nivel. Govoni *et al.* (1986), proponen que esta disminución en la actividad de proteasas alcalinas corresponde el momento preciso en que inicia la funcionalidad del estómago. Estos mismos cambios fueron observados con las larvas de lubina, dentón, sargo, pez ratón, lenguado cola amarilla y dorada (Sabapathy y Teo, 1993; Cahu y Zambonino-Infante, 1994;

Moyano *et al.*, 1996; Alarcón, 1997; Baglolle *et al.*, 1998; Cara *et al.*, 2002), aunque varios días después que en las larvas de la cabrilla arenera, lo que puede explicarse ya que estas especies son de afinidad templada y su desarrollo es más lento, mientras que la cabrilla arenera es de afinidad tropical (Fischer, 1995), por lo que su desarrollo es más acelerado, lo cual responde a una adaptación evolutiva que le permite asegurar su supervivencia en el ambiente (Stepien *et al.*, 2000). Además, se sabe que una vez que el estómago se vuelve funcional, se forman la totalidad de los ciegos pilóricos y se completa la longitud y enrollamiento del intestino, este último incrementa su función hacia la absorción de nutrientes, mientras que el estómago realiza la mayor parte de la digestión (en peces gastros) (Govoni *et al.*, 1986).

Al relacionar los cambios en las actividades de proteasas alcalinas con los datos generados a partir de los zimogramas, destaca la presencia de dos bandas con actividad, las cuales fueron parecidas a los pesos moleculares de tripsinas y quimotripsinas observadas en otros peces marinos (Díaz *et al.*, 1998). Estas bandas son conservativas a lo largo de la crianza larvaria de la cabrilla arenera, además de no estar aparentemente relacionados con los alimentos vivos (rotífero y nauplio de *Artemia*). Asimismo, aparecen otras dos bandas muy cercanas a las anteriormente mencionadas, que a partir del día 15 se mantienen en número aunque con actividades variables hasta el día 30 DDE. Este incremento en el número de bandas puede deberse a que a partir del día 12 DDE, inicia un proceso de maduración final en el que se completa la maquinaria enzimática de las larvas con la posible aparición de otras proteasas tipo tripsina, quimotripsina o elastasa, que tienen pesos moleculares muy parecidos y que hidrolizan a los mismos sustratos, como han sido identificadas en adultos del bacalao del

Atlántico (Ásgeirsson *et al.*, 1998). Otra posible causa es que la técnica utilizada permite que las proteasas ácidas de las larvas de cabrilla arenera tenga cierta actividad a pH de 8.3 y hayan podido revelarse en este tipo de zimograma, ya que se ha observado que la pepsina es muy estable a los cambios de pH, lo cual ha sido demostrado con en el bonito (Kubota y Ohnuma, 1970), la sardina (Noda y Murakami, 1981), el salmón (Norris y Elam, 1940), el bacalao (Brewer, 1984) y la merluza (Sánchez-Chiang y Ponce, 1981). Esta alta resistencia de las proteasas ácidas fue observado en juveniles de la cabrilla arenera (este tema será abordado a detalle en el apartado 5.4.2). Por otra parte, se desconoce el efecto del SDS (duodecil sulfato sódico) sobre la actividad y estabilidad de la pepsina de la cabrilla arenera, por lo que sería necesario profundizar en el conocimiento de proteasas ácidas, al observarse dos nuevas bandas que aparecieron a partir del día 12 DDE pueden ser proteasas ácidas estables a ese pH. Sin embargo, existe información que se contrapone a esta teoría donde se ha demostrado que para especies como la dorada, su actividad desaparece al utilizar este detergente (Díaz *et al.*, 1998).

Al comparar el zimograma de actividad de proteasas alcalinas de las larvas de cabrilla arenera (de 4 a 7 bandas a lo largo de la ontogenia) con lo observado en larvas de dorada, las cuales se corrieron bajo las mismas condiciones, se observó un número similar de bandas (de 5 a 8), lo cual corresponde a especies que tienen una buena capacidad digestiva, ya que pueden degradar una gran variedad de alimentos (Moyano *et al.*, 1996): Por esto se puede considerar a las larvas de la cabrilla arenera como carnívoros oportunistas con tendencia al omnivorismo, al igual que para las larvas de la dorada, en especial antes de los 15 DDE (Moyano-López, comunicación personal). Asimismo, esto ha sido

también comprobado por Cara *et al.* (2002) al realizar la ontogenia enzimática del sargo *Diplodus sargus*, los cuales detectaron hasta 8 bandas con actividad de proteasa alcalina. Estos autores concluyen que esta especie presenta una buena capacidad enzimática al observarse las principales proteasas en el momento de la apertura de la boca, un gran número de isoformas diferentes, una carencia en el patrón de bandas activas en relación con la edad y una buena correlación entre los cambios en la intensidad de las bandas con las fluctuaciones medidas en la actividad específica de los extractos de larvas de diferentes edades. Además que en este organismo, la banda más activa se encontró en el rango de 29-36 kDa, lo cual corresponde con el promedio de masas moleculares de proteasas del tipo tripsina, las cuales también fueron encontradas en las larvas de cabrilla arenera y ha sido reportada en otras especies de peces (Ueberschär, 1993).

La ontogenia de la pepsina es un indicador bastante fiable que permite detectar el momento en el que inicia la maduración del estómago, y por consecuencia, el cambio de la capacidad digestiva de las larvas, siendo el estómago el órgano más importante de degradación de alimentos y el intestino el órgano que preferentemente realizar la absorción de los nutrientes liberados como ha sido observado en larvas de la dorada y el lenguado sol después de los 20 DDE (Moyano *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999; Fernández-Díaz *et al.*, 2001). En el caso de las larvas de la cabrilla arenera, este proceso fue detectado a partir del día 12 DDE, sin embargo, hasta el día 25 DDE es cuando esta actividad es la principal, superando a las proteasas alcalinas. Al comparar esta actividad con la probada a través de técnicas electroforéticas, se observó esta misma tendencia, donde a partir del día 12 DDE se presentó una sola banda con actividad de proteasas ácidas. Debido a las características de la técnica

empleada, no fue posible determinar su peso molecular, pero aparentemente es muy parecida a la pepsina porcina purificada, ya que fue corrida en el mismo ensayo y presentaron una migración y revelado similares. Esta banda va aumentando gradualmente su actividad hasta llegar a su máximo para el día 30, lo cual concuerda totalmente con los ensayos *in vitro*. Se sabe que este tipo de enzima se presenta cuando la larva se ha transformado a juvenil, ya que el estómago se vuelve funcional y cambia el pH dentro de este órgano (Tanaka *et al.*, 1972; Kawai e Ikeda, 1973a y b; Alliot *et al.*, 1977; Vu, 1983; Díaz-López *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 1999; Gawlicka *et al.*, 2001). Se ha sugerido que antes de la aparición del estómago y la presencia de actividad pepsina, la mayor actividad está dada por las proteasas alcalinas (Ribeiro *et al.*, 1999), lo que aparentemente es una respuesta adaptativa a la carencia de proteasas ácidas y esta regulada por respuestas neurales y humorales (Hjelmeland *et al.*, 1983; Lauf y Hoffer, 1984; Hjelmeland *et al.*, 1988; Einarsson y Davies, 1996).

Es evidente que de la misma manera que para las proteasas alcalinas, la afinidad que tiene la cabrilla arenosa a ambientes tropicales aceleró la aparición y funcionalidad de la actividad pepsina, ya que se detectó antes que en otras especies como la dorada, lubina y barramundi (Díaz *et al.*, 1998; Zambonino y Cahu, 1994b; Walford y Lam, 1993). En este mismo contexto, el trabajo de Peña-Martínez *et al.* (2003) con larvas de la cabrilla arenosa demostró la aparición de glándulas gástricas a los 16 DDE; sin embargo, la discrepancia en el día en que aparece la capacidad digestiva del estómago entre el estudio de Peña-Martínez *et al.* (2003) y el presente trabajo, podría deberse a diferencias entre las técnicas empleadas (histológica vs. bioquímica), ó que hubiese diferencias en las características del cultivo, ya sea en aspectos de

alimentación y nutrición, o en cuanto a condiciones ambientales durante el cultivo larvario.

La actividad tripsina estudiada en las larvas de cabrilla arenosa, mostró una gran similitud en las fluctuaciones a lo largo de la ontogenia que en la actividad general de proteasas alcalinas, lo que permite suponer que una buena parte de proteasas presentes en las larvas desde la eclosión son del tipo tripsina. Esto concuerda con lo encontrado por Kurokawa y Zusuki, (1996) con larvas del lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*, donde se encontró, a través de técnicas inmunohistoquímicas, la presencia y secreción de tripsinógenos desde el día 3 DDE, siendo esta actividad no influenciada por la presencia de alimento en el tracto digestivo de las larvas. Esta misma relación fue encontrada por Oozeki y Bailey (1985) con larvas del abadejo de Alaska *Theragra chalcogramma*, donde se detectó la presencia de esta actividad desde la eclosión, aumentando hasta llegar a su máximo en el día 17 DDE, para después decaer y permanecer constante hasta el día 40 DDE. Así también, en las larvas del lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* una alta actividad tripsina ha sido detectada tempranamente y después una caída para mantenerse constante durante el resto del período larvario (Gawlicka *et al.*, 2000). Al comparar con las larvas de la dorada, a través de estudios *in vitro*, se detectó la presencia de tripsina desde el día 3 DDE, además de atribuirle a esta actividad un 55 % de participación del total de la actividad de proteasas alcalinas (Díaz-López *et al.*, 1997). Asimismo, en el estudio de Cuvier-Péres y Kestemont (2002) con larvas de la perca europea *Perca fluviatilis*, se detectó esta actividad desde la eclosión y fue incrementándose durante los primeros 7 DDE para decaer en el día 16 DDE. Mientras que para las larvas de la lubina *Dicentrarchus labrax* la actividad se observó hasta el día 4 DDE, la cual

fue incrementándose hasta el día 19 y después decaer para el día 23 DDE (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a). En el caso de la actividad tipo quimotripsina, sus fluctuaciones difieren de las de proteasas alcalinas y tripsina ya que se observó una actividad relativamente constante desde el día 2 DDE. Al comparar la aparición de tripsina contra quimotripsina, ambas surgen prácticamente al mismo momento (2 DDE), pero la actividad de la quimotripsina es mayor, aunque esto depende en gran medida del tipo de sustrato utilizado, por lo que no es posible determinar cual es el porcentaje real de participación del total de las proteasas alcalinas. Esto no concuerda totalmente con lo observado en larvas de dorada, ya que en esta especie la tripsina es la primera actividad detectada y hasta el día 6 aparece la quimotripsina (Díaz-López *et al.*, 1997), pero concuerda con lo encontrado en las larvas de la lobina rayada *Morone saxatilis*, y el lenguado Dover (*Solea solea*) donde la primera y mayor actividad detectada fue la quimotripsina, seguida de la tripsina (Baraggi y Lovell, 1986; Clark *et al.*, 1986). Para las larvas de la perca europea, se detectó su actividad tempranamente, aunque su incremento fue más lento (23 DDE) y con menor intensidad que la tripsina (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002).

En el aspecto ontogenético, existen pocos trabajos que hayan estudiado a las exopeptidasas, además que en muchos casos se utilizan sustratos diferentes para su cuantificación, por lo que su comparación se vuelve muy difícil. La única exopeptidasa medida durante la ontogenia de la cabrilla arenosa fue la leucina aminopeptidasa. Esta enzima mostró una baja actividad durante el primer día de vida de la larva e incrementó su actividad a partir del día 2 DDE (apertura de boca). Esta baja actividad de la leucina aminopeptidasa durante los primeros días de crianza

también ha sido detectada en larvas de lubina (4-5 DDE) y tilapia (3 DDE), donde se ha cuantificado su actividad por técnicas *in vitro*, observándose la presencia de esta enzima y zimógenos granulares en el intestino de la larva justo antes de la primera alimentación (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a; Tengjaroenkul *et al.*, 2002). Asimismo, esta actividad fue detectada en el epitelio de la región distal del tubo digestivo de embriones de rodaballo *Scophthalmus maximus*, mientras que en larvas alimentadas se observó su actividad en la parte medio y posterior del intestino al utilizar técnicas histoquímicas (Cousin *et al.*, 1987). La presencia de esta enzima ha sido atribuida a una programación genética de su expresión que permite la absorción de los nutrientes del vitelo, aunque su actividad se incrementa por la adición de las presas vivas (Zambonino-Infante y Cahu, 1994b; Tengjaroenkul *et al.*, 2002). Por otra parte, en el día 12 DDE se detectó el máximo de actividad, para después decaer a partir del día 15 y mantener constante su actividad hasta el final del período larvario. Al comparar este resultado con los obtenidos para el lenguado Dover (Clark *et al.*, 1986), el rodaballo (Cousin *et al.*, 1987) y la lubina (Cahu y Zambonino, 1997), se detectó la misma tendencia a mostrar un pico máximo en algún tiempo durante la crianza y después una caída abrupta. Este tipo de fluctuaciones han sido relacionadas, junto con el incremento de las enzimas del borde de cepillo (fosfatasa alcalina), como el momento en el que se da la maduración final de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Aunado a esto, la caída en la actividad de esta enzima después del día 12 DDE, se puede relacionar con el inicio de la digestión de proteasas ácidas que se detectó para esta misma edad, aunque no con su máximo de actividad; por lo que es probable que los cambios en la actividad de la leucina aminopeptidasa se relacionen más a una característica genética que a un efecto

de los cambios del alimento vivo (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a).

No solamente existen las enzimas que se secretan al lumen a partir de zimógenos inactivos (pepsinógenos, tripsinógenos, quimotripsinógenos, etc.), sino también una serie de enzimas complementarias que se observan tanto en el citoplasma de los enterocitos (peptidasas, disacaridasas y esterases) como en la membrana de borde de cepillo de los mismos (fosfatasa alcalina), las cuales no solamente tienen la función de hidrolizar moléculas extracelularmente, sino también el transporte hacia el interior de estas células y su posterior hidrólisis intracelular (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Estos dos grupos de enzimas son importantes para determinar el momento en el que se ha alcanzado la maduración del tracto digestivo de las larvas. Se ha detectado una disminución marcada de la actividad de enzimas citosólicas (leucina-alanina peptidasa) y un aumento en la actividad de enzimas del borde de cepillo (fosfatasa alcalina y aminopeptidasa N), por lo que la

inversión o el cruzamiento de ambas actividades ha sido utilizado como un indicador de la maduración. Adicionalmente, a la aparición y funcionalidad de las glándulas gástricas y la pepsina (Cahu y Zambonino-Infante, 1994a, 1995). En el presente estudio, no se observó la inversión de las actividades leucina alanina peptidasa y fosfatasa alcalina, debido a que se utilizaron extractos de cuerpo entero de las larvas, a diferencia de los trabajos de Zambonino-Infante y Cahu (1994a), quienes realizan una técnica de extracción de las enzimas del borde de cepillo y del citoplasma de los enterocitos a partir de la disección de la parte intestinal de las larvas.

Tomando como base el trabajo de Moyano *et al.* (1996) con larvas de la dorada y la información publicada por varios autores, en la figura 38 se muestra la aparición de las proteasas alcalinas y funcionalidad estomacal de las larvas de la cabrilla arenera, así como los estadios de desarrollo a lo largo del tiempo, comparándolas con las de otras especies de peces.

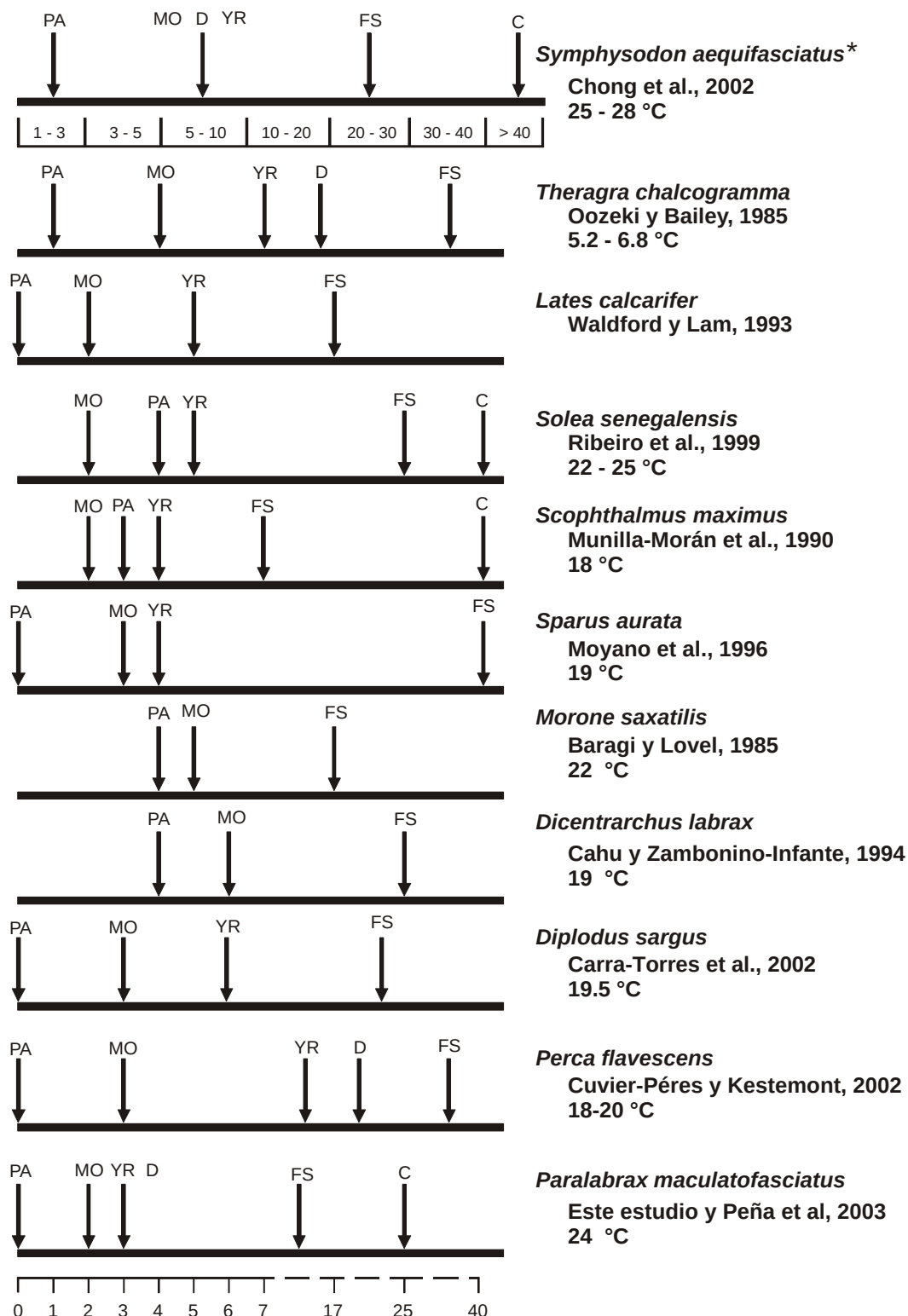


Figura 38. Comparación de los estadios de desarrollo en el tracto digestivo de varias especies de peces. PA: actividad proteasa alcalina; MO: apertura de boca; YR: absorción de vitelo; FS: estómago funcional; C: Sistema digestivo completo; D: Diferenciación del sistema digestivo. * La primer escala es representativa solamente para *Symphysodon aequifasciatus*.

5.4.1.2. Esterasas no específicas (Lipasas).

Muchos estudios han resaltado la necesidad de enriquecer los alimentos de las larvas (vivos o inertes) con emulsiones que contengan altas concentraciones de ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 y n-6, especialmente con aquellos que se consideran esenciales como el ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) y ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3); ya que éstos no se encuentran de forma natural en los alimentos vivos (rotíferos y *Artemia*), y no pueden ser sintetizados por las larvas (Tocher *et al.*, 1997; Harel *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2000). El objetivo de este enriquecimiento ha sido mejorar la composición de dichos alimentos para incrementar el crecimiento, la supervivencia y calidad de la semilla producida especialmente en el cultivo de peces marinos (Merchie *et al.*, 1995, 1996 y 1997; Geurden *et al.*, 1998a y b; Rodríguez *et al.*, 1998; Bessonart *et al.*, 1999; Czesny *et al.*, 1999; Izquierdo *et al.*, 2000; Sorgeloos *et al.*, 2001). De esta manera, la mayoría de los estudios se han enfocado al desarrollo y uso de dietas altamente enriquecidas con lípidos (> 20% de la materia seca) (Zambonino-Infante y Cahu, 1999; Koven *et al.*, 2001a). Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen la capacidad de las larvas para digerir lípidos durante la ontogenia de los peces marinos (Oozeki y Bailey, 1985; Holt y Sun, 1991; Ozkizilcik *et al.*, 1996; Izquierdo y Henderson, 1998; Martínez *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 1999; Gawlicka *et al.*, 2000; Hoehne-Reitan *et al.*, 2001a y b; Samuelsen *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002; Sidell y Hazel, 2002), especialmente por la dificultad que implica el estudio de enzimas que trabajan en la interfase agua/aceite (Jensen, 1983). Además, ninguno de estos estudios han relacionado la capacidad de digerir lípidos en función

de la longitud de la cadena del ácido graso, razón por la cual, se debe tener en cuenta que las lipasas verdaderas no actúan de la misma manera para cualquier tipo de sustrato, ni a lo largo de todo el tracto digestivo, por lo que su papel dependerá de la especie y el período de vida que se este investigando (Hirji y Courtney, 1983).

Se debe recordar que, previamente al estudio sobre la ontogenia de esterases no específicas y lipasa, se determinó el pH óptimo de la capacidad esterase de la cabrilla arenosa utilizando los tres sustratos a base de p-nitrofenil- (PNF), donde se observó que el pH óptimo al que funcionan estas enzimas, estuvo entre 7.5 y 9, por lo que para conocer la ontogenia de esterases no específicas las menciones se realizaron a un pH de 7.5. Al realizar el ensayo de pH óptimo, se detectó que la actividad de estas enzimas, aumentó en la medida que el tamaño de la cadena de ácido graso disminuyó. Además se comprobó que este tipo de técnicas *in vitro* resultan difíciles de aplicar, ya que no se realiza ningún tipo de emulsión, y en la medida que el ácido graso es de mayor tamaño, su capacidad de solubilización disminuye, y por consecuencia la acción de las lipasas también se ve disminuida enormemente, lo que dificulta diferenciar entre lipasas vs. esterases no específicas (Beisson *et al.*, 2000).

En el caso de la ontogenia de la actividad esterase no específica (lipasa) de las larvas de cabrilla arenosa, se observó un incremento desde la eclosión y hasta el día 7 DDE al usar ambos sustratos de cadena media (*p*-nitrofenil caprato que tiene un ácido graso de 10 carbonos y β -naftil caprilato que tiene un ácido graso de 8 carbonos), siendo este el pico de máxima actividad y después de ese día se detectó la caída de la actividad. Lo anterior concuerda con lo observado en larvas del lenguado sol, donde a partir del día 5 DDE se detectó una caída de la actividad lipasa

(Martínez *et al.*, 1999). Otro ejemplo, que refuerza la aparición temprana de lipasa en larvas es el de Kapoor *et al.* (1975), ya que se ha observado que el hígado y el epitelio mucoso son la fuente general de esta actividad al observarse zimógenos granulares por medio de técnicas histológicas, los cuales son los precursores de las actividades de triacilglicerol hidrolasas, hidrolasas de ceras y fosfolipasas A2, siendo reportadas en huevos y embriones de varias especies de peces marinos (Ozkizilcik *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1998). En los embriones del rodaballo *Scophthalmus maximus* se presentan enzimas lipolíticas capaces de hidrolizar triacilglicérols y fosfolípidos, los cuales son usados como fuente de energía metabólica, aunque el tipo y la cantidad de lípidos pueden variar entre especies (Fraser *et al.*, 1988; Sargent *et al.*, 1989; Sargent, 1995).

Kjørsvik y Reiersen (1992), observaron partículas lipídicas entre las células epiteliales del intestino en larvas de rodaballo alimentadas con rotíferos enriquecidos. Esta distribución intercelular no fue encontrada en larvas alimentadas con dietas bajas en lípidos. El autor sugiere que la capacidad digestiva de las larvas fue sobrecargada por la alta concentración de lípidos dietarios, disminuyendo la absorción proteínica en el intestino de las larvas. No obstante, Segner *et al.* (1994) reportaron la absorción activa de lípidos en los enterocitos de las larvas de rodaballo inmediatamente después de la primera alimentación. Este tipo de fenómeno se observó en larvas de cabrilla arenosa a partir del día 6 DDE donde se detectaron numerosas vacuolas en la región supranuclear de la parte media del intestino anterior y en el borde superior de los pliegues de la mucosa (Peña-Martínez *et al.*, 2003).

En el estudio de Ozkizilcik *et al.* (1996), la presencia de la actividad lipolítica en huevos y larvas sin alimentar fue detectada y parece jugar un papel

importante en el catabolismo durante la inanición. Esta evidencia apoya lo observado en el presente estudio, aunque la actividad lipasa de las larvas de cabrilla arenosa sin alimentar decayó después del día 3 DDE, lo que está directamente relacionado con el agotamiento de la reserva vitelina, la cual solamente soporta la inanición por un corto tiempo antes de que la larva muera (máximo 5 días) (Alvarez-González *et al.*, 2001c). Además, el presente estudio confirmó que la digestión de lípidos en larvas alimentadas no está gobernada por enzimas exógenas, al menos durante los primeros 10 DDE (alimentación con rotíferos); aunque es evidente que la adición de presas y el proceso de enriquecimiento de las mismas, tiene una participación importante en la regulación de la actividad lipasa. Esto se ha observado con larvas del abadejo de Alaska *Theragra chalcogramma*, donde dependiendo del tipo de presa y el tipo de enzima su contribución a la digestión total de las larvas puede ser significativa, aunque para esta especie, la contribución de las lipasas de las presas fue muy baja de 0.6 a 4.4 %. Estos autores mencionaron dos aspectos importantes que concuerdan ampliamente con lo observado en las larvas de la cabrilla arenosa; el primero es la posible presencia de dos tipos de lipasas dependientes de sales biliares, las primeras que se activan durante el período embrionario, las cuales apoyan la absorción del vitelo (Abousalham y Verger, 2000) y las segundas, que son secretadas directamente por el páncreas, una vez que ha sido absorbido el vitelo, y que hidroliza las grasas provenientes del alimento (Buchet *et al.*, 2000). En segundo lugar, la alta actividad de lipasa durante los primeros días de crianza corresponde a la carencia de un sistema digestivo completo (carencia de estómago funcional y enrollamiento del tubo digestivo), que compensa el corto tiempo de permanencia del alimento dentro del tracto (Oozeki y Bailey, 1985).

Esto mismo fue observado para las larvas del barramundi *Lates calcarifer* y del rodaballo *Scophthalmus maximus* (Walford y Lam, 1993; Segner *et al.*, 1994), donde se detectaron actividades altas durante los primeros días de vida de la larva y luego disminuciones en la actividad; estos autores relacionaron estas fluctuaciones a los cambios de alimento durante el larvicultivo. En las larvas de la lobina rayada *Morone saxatilis* y el lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus*, la actividad lipasa ha sido detectada tempranamente y durante todo el período larvario (Ozkizilcik *et al.*, 1996; Gawlicka *et al.*, 2000), como en el caso de las larvas de la cabrilla arenera. Martínez *et al.* (1999) con larvas del lenguado sol *Solea senegalensis* encontraron que la máxima actividad lipasa se presentó en el día 10 DDE y se relacionó con el desarrollo del páncreas exócrino. Sin embargo, existe un estudio donde dicha actividad no fue detectada tempranamente como en el caso de Cousin *et al.* (1987), quienes observaron la aparición de la actividad lipasa en larvas del rodaballo hasta el día 15 DDE, explicando que antes de este día el catabolismo de los lípidos puede ser llevado a cabo solamente por esterasas, aunque son menos eficientes que las lipasas verdaderas.

Por otra parte, no existen estudios que hayan tratado de caracterizar la ontogenia de la actividad lipasa en peces marinos a través de estudios electroforéticos, por lo que la comparación con otros autores resulta precaria. Es evidente que al usar las dos técnicas PAGE y SDS-PAGE, fue posible revelar al menos dos bandas con actividad lipolítica desde el día 2 DDE. Sin embargo, al utilizar el PAGE, existe el problema que durante la migración no se desnaturaliza la proteína, por lo que no se pueden separar las diferentes bandas o isoformas, además que no es posible determinar los pesos moleculares de las bandas reveladas. Por otra parte, al utilizar el SDS-PAGE, se pudieron

separar tres bandas con actividad lipolítica, una de alto peso molecular (~ 60,000 daltons), la cual es conservativa durante los 30 días de crianza, pero que presenta ciertas fluctuaciones en su actividad (esta banda no aparece en ninguno de los alimentos vivos evaluados) y otra de mediano peso molecular (~ 40,000 daltons), la cual fue parecida en peso molecular a la lipasa pancreática porcina (50,000 daltons), y que desaparece a partir del día 9 DDE. Esta banda no ha sido relacionada con las lipasas provenientes de los rotíferos, ya que solamente se reveló una sola banda que es de menor peso que la detectada en las larvas. La tercer banda se observó después del día 12 DDE, la cual es de bajo peso molecular (~ 30,000 daltons). Esta banda esta aparentemente muy relacionada con la banda que se reveló en la *Artemia* ya que tiene un peso molecular similar, además de que la banda de la *Artemia* presentó una alta actividad comparada con las bandas de las larvas de cabrilla arenera, por lo que pudo haber participado en la actividad lipasa total de las larvas.

Un aspecto relevante que cabe señalar en esta parte de la investigación, es el posible efecto de la utilización de SDS. Existen reportes donde se ha demostrado que el SDS tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad lipasa de peces marinos (Díaz-López *et al.*, 1998). Esto se debe tomar en cuenta, ya que en el SDS-PAGE, el detergente está incluido a una concentración total de 0.1 %, tanto en el gel como en los amortiguadores de corrimiento, por lo que se debe considerar que el detergente sí inhibió la acción de las lipasas de la cabrilla arenera en un 75 % al realizarse el ensayo *in vitro*. Desde esta perspectiva, se desconoce si el revelado de las bandas de actividad usando el SDS-PAGE constituyen una lipasa verdadera o solamente esterasas; ya que por un lado, al realizar el copolimerización del sustrato en el gel, se prepara una emulsión al mezclarlo

con el buffer y el tauracolato de sodio; por lo que al polimerizar el gel, el sustrato queda embebido de una forma homogénea, donde la acción de lipasas verdaderas es posible. Sin embargo, se sabe que algunas proteasas con capacidad esterasa pueden resistir la acción del SDS, por lo cual este tipo de enzimas pudiesen haber sido reveladas en el zimograma.

Actualmente existe una gran polémica alrededor de este tipo de estudios, donde tradicionalmente se ha usado β -naftil caprilato como sustrato representativo de la actividad lipasa. Como se mencionó anteriormente, las lipasas verdaderas dependientes de sales biliares tienen que funcionar en la interfase agua/aceite, por lo cual requieren de estas sales para lograr emulsionar las grasas y permitir su acción. Además muchas de estas lipasas requieren la acción de un pequeño péptido llamado colipasa, que funciona ligándose al carboxilo terminal de la lipasa y no al sitio activo, con lo cual la molécula estabiliza su conformación activa y permite que el sitio activo hidrofóbico se ligue al sustrato para realizar la hidrólisis en la interfase (van Tilbeurgh *et al.*, 1999). Evidencias experimentales han indicado que los residuos de serina e histidina en el sitio activo de las lipasas, deben estar en una forma correcta; además, la histidina debe estar adecuadamente orientada para poder extraer el protón del grupo hidroxilo de la serina (que es el paso preliminar necesario para permitir que un par de electrones estén disponibles para el subsiguiente ataque nucleofílico sobre la unión acil del enlace éster del sustrato glicerado). Asimismo, se ha relacionado un residuo de aminoácido conteniendo un ácido carboxílico como grupo lateral (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) cercano al sitio activo para lograr la formación tridimensional de la caja que permitirá al sustrato ligarse antes de que el enlace éster sea atacado.

Por otra parte, el β -naftil caprilato es un sustrato sintético que contiene un pequeño ácido graso de 8 carbonos, por lo que hasta cierto punto, es relativamente fácil de emulsionar o diluir en agua, y al agregar un extracto crudo para hidrolizar al sustrato, cualquier tipo de enzimas que tiene capacidad esterasa (tripsina, quimotripsina, entre otras), pero que no son lipasas verdaderas, tienen la capacidad de hidrolizarlo. Es por esto que en la mayoría de los casos se debe de hablar de capacidad esterasa y no lipasa. Otro problema que se presenta es que en la medida que un ácido graso incrementa la longitud de su cadena, su solubilización disminuye, al grado de formar micelas, las cuales son difíciles de disgregar y solubilizar, lo que provocará que la acción de las lipasas verdaderas se vea disminuida (Beisson *et al.*, 2000). No son estos los únicos aspectos que afectan la hidrólisis de lípidos por parte de las lipasas verdaderas, ya que por ejemplo, la posición del ácido graso (1, 2 ó 3) en el triacilglicérido o fosfolípido permitirá su hidrólisis, además del número y posición de las insaturaciones a lo largo de la cadena (Hunter, 2001).

Al estudiar la capacidad de las larvas de la cabrilla arenosa para hidrolizar lípidos en función del largo de la cadena del ácido graso, se puso de manifiesto, tanto en larvas en inanición como alimentadas, que en la medida que el ácido graso aumenta de tamaño, es más difícil su hidrólisis. Esta dificultad puede estar regida por dos aspectos: 1) Los ensayos *in vitro* no trabajan con emulsiones, sino que se agrega el sustrato directamente en el amortiguador, por lo que la acción de las lipasas verdaderas puede estar muy restringida a una pequeña cantidad del sustrato que se encuentra en la interfase, mientras que otra parte del sustrato pudo haberse solubilizado y ser hidrolizado por esterasas no específicas (por lo cual no se puede discernir entre lipasas verdaderas y esterasas), y 2) La

formación del punto crítico micelar en la cual los lípidos se protegen del agua, y por consecuencia de la acción de las lipasas, lo que puede ocasionar que se subestime la hidrólisis de lípidos dependientes de sales biliares (Beisson *et al.*, 2000).

Estos problemas se tienen que tomar en cuenta cuando se reporta la actividad lipasa de alguna especie, utilizando este tipo de sustratos sintéticos por técnicas *in vitro*, ya que frecuentemente este tipo de ensayos no son lo suficientemente sensitivos para la determinación de las actividades individuales. Además, las actividades enzimáticas dependen de su origen, por ejemplo enzimas intracelulares, enzimas exógenas de las presas, enzimas pancreáticas y lipasas gástricas, no pueden ser distinguidas al homogenizar larvas completas. Además, frecuentemente la variación de las condiciones de los ensayos enzimáticos *in vitro*, limitan la comparación directa de las actividades enzimáticas encontradas entre las especies. Es por esto, que los métodos histoquímicos presentan ventajas permitiendo localizar la zona con la actividad enzimática; sin embargo, tienen la desventaja de que difícilmente pueden cuantificarla. De esta manera, para tener un panorama global de la acción de este tipo de enzimas es recomendable conjuntar varios tipos de estudios (Abousalham y Verger, 2000; Gawlicka *et al.*, 2000).

Al utilizar homogenizados de cuerpo completo se puede sobreestimar la actividad lipasa de los tejidos (Oozeki y Bailey 1995; Lazo *et al.* 1999). Este problema podría ser solucionado tomando en cuenta si los extractos se prueban con fluorofosfato de disopropil (Culling, 1974), ya que se ha detectado que las esterases pancreáticas son resistentes a este compuesto (Cousin *et al.*, 1987). Este problema de identificación y cuantificación se podría resolver al usar varias técnicas, como por ejemplo fluorescencia, la cual ha sido

aplicada con éxito por Izquierdo y Henderson (1998) y con esto lograr evaluar con mayor certidumbre la participación real de este tipo de enzimas en la digestión (Martínez *et al.*, 1999).

Por otra parte, se están estudiando más a fondo este tipo de lipasa verdaderas, con técnicas más novedosas, encontrándose que la lipasa digestiva más importante en teleósteos es probablemente una lipasa dependiente de sales biliares (BSDL) del páncreas (Patton *et al.*, 1975; Tocher y Sargent, 1984; Lie y Lambertsen, 1985; Gjellesvik *et al.*, 1992), que se caracteriza por una alta especificidad por el sustrato y un proceso complicado para la unión del sitio activo. Una BSDL se aisló por primera vez en el tejido pancreático del bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (Gjellesvik, 1991), quien también purificó y caracterizó la enzima. Usando técnicas inmunológicas y un antisuero contra BSDL de bacalao, la lipasa fue observada en larvas de la misma especie, sin embargo la localización de BSDL en huevos y embriones tiene que ser demostrada (Hoehne-Reitan *et al.*, 2001a y b). Recientemente, una BSDL fue aislada del hepatopáncreas de la brema roja *Pagrus major* (Iijima *et al.*, 1998). Es por esto, que en el caso de la ontogenia de las larvas de la cabrilla arenosa, sería necesario profundizar aún más en los estudios sobre el tipo de lipasas que se presentan a lo largo de este período temprano de vida, por medio de este tipo de técnicas y complementándolas con estudios moleculares a fin de determinar su expresión (Tovar-Ramírez *et al.*, 2000).

5.4.1.3. Amilasa

La actividad amilasa de las larvas de la cabrilla arenosa, mostró un incremento a partir de la absorción del vitelo (2 DDE), para después mantenerse. Se debe resaltar que a partir del día 18 DDE, se observó una

caída abrupta de la actividad, lo cual ha sido observado en larvas de lubina para esa misma edad (Zambonino-Infante y Cahu, 1994b). Al comparar este estudio con el de la perca Europea se observó la misma tendencia con dos incrementos de la actividad, el primer incremento para el día 9 DDE y el segundo entre los días 21 y 23 DDE, mientras que para las larvas de a cabrilla arenera, fueron observados más tempranamente (día 2 y 18 DDE). Esto concuerda con lo mencionado por diversos autores, donde la actividad amilasa específica es muy alta durante los períodos larvales y decrece rápidamente en el momento de su transformación a juvenil (Moyano *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Buchet *et al.*, 2000). Péres *et al.* (1998) y Ribeiro *et al.* (1999) encontraron más altos niveles de mRNA de amilasa en larvas jóvenes que en juveniles de lubina, y sugieren que la disminución coordinada de la actividad específica y los niveles de mRNA de la amilasa están reguladas transcripcionalmente durante el desarrollo larvario. Douglas *et al.* (2000) encontraron en larvas del lenguado de invierno *Pleuronectes americanus* un pico máximo de actividad amilasa a los 20 días aproximadamente, que disminuyó durante el proceso de metamorfosis. Además, esta caída en la amilasa ha sido observada independientemente de la concentración de glucosa en la dieta. En el estudio de Gawlicka *et al.* (2000), se detectó la aparición de la actividad hasta varios días después de la absorción del vitelo, incrementándose lentamente conforme la larva creció; por lo que concluyen que para el lenguado de invierno, la capacidad de digerir carbohidratos es limitada, y lo explican ya que estas larvas son cultivadas a bajas temperaturas (4-5 °C), por lo que la actividad y estabilidad de esta enzima se ve fuertemente disminuida. Otro ejemplo de este tipo de estudios es el de Zambonino-Infante *et al.*, (1996), con larvas de lubina, donde

se detectaron altas actividades durante los primeros de vida, para después decaer abruptamente y volver a incrementarse ligeramente para mantenerse constante. Péres *et al.*, (1996) sugieren que esta disminución en la actividad amilasa durante el desarrollo larvario está genéticamente programada. Este cambio particular en la amilasa puede reflejar diferentes requerimientos nutricionales durante los períodos de vida (Krogdahl y Sundby, 1999), como fue observado por primera vez por Buddington (1985) para las larvas del esturión de lago *Acipenser fulvencens*.

También se ha observado que el contenido de almidón dietario puede modular la actividad amilasa específica en la lubina cuando se agregó un 25 % de glucosa en dietas para larvas, la disminución de la actividad amilasa fue menor que en dietas con 5 %. En el caso de las larvas de lubina se ha determinado esta modulación en la actividad amilasa por el contenido de almidón en la dieta, que es eficiente hasta el día 18 DDE y podría ser el resultado de una regulación post-transcripcional de la síntesis de amilasa (Péres *et al.*, 1998). En larvas de corvina también se determinó una modulación eficiente de la síntesis de amilasa en respuesta a la incorporación de almidón en la dieta (Buchet *et al.*, 2000). Sin embargo, no se puede considerar que las larvas de la lubina o la curvina tengan una predisposición hacia una mayor utilización de carbohidratos como fuente de energía durante las dos primeras semanas después de la eclosión; además, de que un exceso de carbohidratos provoca una fuerte disminución en el crecimiento y supervivencia de las larvas. Asimismo, niveles altos de carbohidratos también ocasionan la disminución de la actividad amilasa (Péres *et al.*, 1996). La expresión es entonces principalmente preprogramada y solamente submodificada por la composición de la dieta, esto va de acuerdo con los

resultados de los estudios del desarrollo de enzimas pancreáticas en diferentes especies de peces y otros vertebrados (Munilla-Moran y Saborido-Rey, 1996b; Henning *et al.*, 1994; Buddington *et al.*, 1997). Sin embargo, se debe resaltar que para las larvas de la cabrilla arenera falta determinar hasta qué grado la actividad amilasa esta sujeta a una programación transcripcional como lo comentan otros autores, por lo que será necesario realizar una mayor profundización del estudio de la actividad amilasa, así como de su expresión genética durante el larvicultivo, aunque es un hecho que la actividad amilasa esta presente desde el principio aún así, la presencia del alimento vivo puede estar influenciada por la presencia de la presas.

Por otra parte, se pudieron revelar una serie de bandas con actividad amilolítica al utilizar la técnica PAGE en condiciones nativas, dando como resultado la presencia de 2 bandas con actividad en las larvas en inanición, a las cuales no se les puede determinar el peso molecular, pero que demuestran que desde la eclosión, las larvas de cabrilla presentan una buena capacidad amilasa, la que pudiese estar relacionada con la absorción de las reservas del vitelo (Krieger y Fleig, 1999). Al aplicar la técnica propuesta por Martínez *et al.* (2000), se pudieron revelar al menos 4 bandas con actividad, las cuales no fueron totalmente conservativas a lo largo de la crianza, y que pueden ser consideradas como isoformas, ya que tienen pesos moleculares similares (desde 80 a 100 kDa). Alarcón *et al.* (2001) detectaron en juveniles de dorada una sola banda con actividad amilasa con un peso molecular de 97 kDa que es similar a las observadas en las larvas de la cabrilla arenera. Estos resultados concuerdan con lo observado en ratas por Sander y Rutter (1972) quienes detectaron 2 isoformas. En camarones se han detectado hasta seis isoformas

(Wormhoudt *et al.*, 1995) y en humanos se han revelado en la saliva 4 isoformas que tienen pesos moleculares superiores a 100 kDa (Malacinski y Rutter, 1966). Asimismo, Fernández *et al.* (2001) revelaron 2 bandas con actividad amilasa para adultos de varias especies de espáridos (*Pagrus pagrus*, *Pagellus erythrinus*, *P. bogaraveo*, *Boops boops* y *Diplodus annularis*) y 5 bandas con actividad para la tilapia. Sin embargo, al utilizar en este estudio el zimograma en condiciones nativas no se pudo determinar el peso molecular de las bandas en las larvas de la cabrilla arenera. Aunque se debe resaltar que la presencia de un mayor número de bandas con actividad amilasa se relaciona a una mayor tendencia al herbivorismo. Por lo que es posible que las larvas de la cabrilla arenera tengan una buena capacidad de digerir los carbohidratos provenientes del alimento vivo. Es por esto que algunos investigadores recomiendan diferenciar entre los tipos de amilasas (isoenzimas) y la posible influencia en la actividad ocasionada por la flora bacteriana, o la presencia de enzimas exógenas provenientes del alimento (Douglas *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2001). Por otra parte, es posible que el grupo de bandas con pesos aproximados de 80 kDa puedan pertenecer a los rotíferos (desde el día 2 hasta el día 12 DDE), ya que presentan pesos moleculares similares, aunque no se puede determinar el porcentaje de aporte real de enzimas exógenas por parte de los rotíferos. En el caso de las bandas de mayor peso molecular (~ 100 kDa) éstas pertenecen totalmente a las larvas y se mantienen a lo largo del período larvario.

A partir del 18 DDE, se observó una disminución en el número de bandas con actividad amilolítica, lo que concuerda con lo observado en los ensayos *in vitro*, donde también se detectó esta disminución en la actividad, y pudiese relacionarse con el desarrollo total de la capacidad enzimática

digestiva en las larvas de la cabrilla arenera. Estos resultados durante la ontogenia de la actividad amilasa confirman una buena capacidad para la digestión de carbohidratos, lo cual ha sido observado para especies como la dorada (Hidalgo *et al.*, 1999), donde se menciona que esta especie puede ser considerada de hábitos carnívoros, pero con tendencia al omnivorismo, lo que le confiere la capacidad de aprovechar una amplia variedad de alimentos (Alarcón *et al.*, 2001). Es por esto que para las larvas de la cabrilla arenera, el diseño y utilización de dietas inertes durante el larvicultivo parece ser una buena alternativa. Kuz'mina *et al.* (2003) evaluaron la actividad amilasa en nueve peces con diferentes hábitos alimenticios pertenecientes a zonas frías (boreales) y tropicales concluyen que la actividad amilasa decrece en el siguiente orden: bentófagos > zooplanctófagos > depredadores facultativos > típicamente depredadores; de tal manera que las actividades fueron decreciendo de la siguiente manera: carpa *Cyprinus carpio*, sardinela *Sardinella aurita*, pilchard *Sardina pilchardus*, brema *Abramis brama*, rutilo *Rutilus rutilus*, macarela *Trachurus trcae*, burbot *Lota lota*, pike *Esox lucius* y perca *Perca fluviatilis*. Desde esta perspectiva, las larvas de cabrilla arenera pudieran clasificar como depredadores facultativos o zooplanctófagos debido a la alta actividad amilasa que presentan, aunque se requiere profundizar en este tipo de estudios para poder determinar con exactitud a que tipo de hábito ajustan; además, si esa capacidad de digerir carbohidratos se mantiene o cambia en otros períodos de vida, con lo cual se podría evaluar en qué medida la elaboración de dietas inertes que contengan carbohidratos mejoraría el crecimiento y supervivencia durante la crianza de la cabrilla arenera.

5.4.1.4. Fosfatasas.

Otras enzimas de gran importancia fueron las fosfatasas ácidas y alcalinas; estas dos hidrolasas se detectaron tempranamente, aunque las ácidas con mayor actividad que las alcalinas en el momento de la eclosión y hasta la absorción del saco vitelino, siendo este el momento en el que la fosfatasa ácida disminuyó su actividad por debajo de la actividad de fosfatasa alcalina. Por otra parte, se observó el pico de máxima actividad para el día 12 DDE en ambas actividades, aunque la actividad de fosfatasas alcalinas fue mayor que la de las ácidas. Estos resultados permiten generar dos cuestionamientos, el primero es, ¿porqué la actividad fosfatasa ácida fue mayor que la alcalina al momento de la eclosión?. Cuando la larva eclosiona (eleuteroembrión) tiene una alta capacidad de digestión y absorción, aunque esto no se lleva a cabo en el intestino (el cual está cerrado), sino en el vitelo, por lo que parece normal que presente un juego enzimático primario, incluyendo fosfatasas, para lograr esta función (Alarcón, 1997). Sin embargo, parece contradictoria la presencia de fosfatasas ácidas, ya que como se sabe la secreción de ácido no se da sino hasta varios días después cuando se forma el estómago, y por ende la secreción de éstas (Stroband y Dabrowski. 1981; Govoni *et al.*, 1986). Es por esta razón que se piensa que la presencia de este tipo de actividad puede deberse a dos razones 1) que fue medida la presencia de fosfatasa ácida no digestiva, la cual está presente el hígado (lisosomal) y que funciona intracelularmente, en especial al usarse homogenizados enzimáticos de cuerpo completo de larvas (Rüdiger *et al.*, 1998). 2) El producto de un artefacto del método, ya que este tipo de sustrato (p-nitrofenilfosfato) se usa también para la determinación de la fosfatasa alcalina, por lo que sería necesario profundizar en estudios sobre la estabilidad de fosfatasas alcalinas a diferentes pH, y

por otro lado, tratar de determinar cuántos tipos de fosfatasas están presentes en el embrión al momento de la eclosión. Así también, se deberá estudiar si enzimas específicas capaces de hidrolizar los componentes del vitelo (lipovitelina, fosvitin y β -componente) (Hiramatsu y Hara, 1996) u otras enzimas como las corionaceas, catepsinas o proteasas son capaces de hidrolizar enlaces con fósforo (Georgopoulou *et al.*, 1985; Luczynski *et al.*, 1987).

Por otra parte, ¿a qué se debió el pico de actividad máxima de fosfatasas en el 12 DDE?. Al comparar nuestro estudio con el Moyano *et al.*, (1996), los resultados no concuerdan del todo ya que durante la ontogenia de fosfatasas de la dorada, la actividad alcalina fue mayor que la ácida desde el momento de la eclosión y se detectó un pico de máxima actividad para ambas fosfatasas en el día 10 DDE. Mientras que para las larvas de cabrilla arenera, se detectó el pico de máxima actividad para ambas fosfatasas dos días después, siendo del doble de activa en las fosfatasas alcalinas que en las ácidas. La comparación de la actividad de fosfatasas alcalinas de las larvas de la cabrilla arenera, muestra cierta similitud con lo observado en las larvas de la perca Europea, donde se observó un incremento en la actividad desde el día 12 DDE hasta alcanzar su pico máximo en el día 23 DDE. Por otra parte, el estudio de Gawlicka *et al.* (2000) con las larvas del lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* donde se detectó un patrón de crecimiento progresivo en esta actividad, por lo que estos autores consideran que esta especie está preparada para absorber nutrientes desde el momento de la metamorfosis (a los 37 DDE); lo cual se da muchos días después que lo detectado para las larvas de la cabrilla arenera (12 DDE). Esto puede explicarse ya que el lenguado es una especie que habita aguas frías, mientras que la

cabrilla arenera es una especie de afinidad tropical. Como se sabe, este tipo de enzimas intervienen en la absorción y transporte de lípidos y carbohidratos (Fraissee *et al.* 1981), por lo que su aparición y aumento en su actividad ha sido utilizada como un indicador de la maduración de los enterocitos del intestino en larvas de lubina (Cahu y Zambonino-Infante, 1995). De acuerdo a lo observado, se puede pensar que el día 12 DDE es el momento en el que el intestino de las larvas de la cabrilla arenera ya se encuentra maduro, mismo que se ha observado por Peña-Martínez *et al.* (2003) para esta misma especie. Además el incremento de la absorción se ve favorecido por la aparición de la actividad pepsina en el estómago, convirtiéndose en el órgano principal para la digestión (Govoni *et al.*, 1986).

5.4.1.5. Enzimas digestivas en larvas en inanición, alimentadas y presas vivas.

Todas las enzimas cuantificadas en el presente estudio estuvieron presentes en las larvas de la cabrilla arenera en inanición, aunque en general mostraron muy bajas actividades al compararse con las larvas alimentadas a partir del día 2 DDE. Este comportamiento es similar a lo observado para especies como la dorada y la lubina donde se ha detectado la aparición muy temprana de enzimas digestivas sin que exista la adición de alimento vivo (Alarcón, 1997; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Sin embargo, no concuerda del todo con lo observado para otras especies de peces marinos, donde se ha tratado de relacionar y asignar algún porcentaje de participación a las enzimas exógenas provenientes de las presas vivas. Esto se fundamenta en que para algunas especies de peces marinos, la participación enzimática no ha sido observada, pero sí el deterioro de los zimógenos granulares pancreáticos y de la actividad proteolítica en el canal

alimentario de las larvas en inanición, lo que implica que la producción de enzimas es variable y depende de muchos factores tanto internos como externos (O'Connell, 1976; Theilacker, 1978; Dabrowski, 1982; Hjelmeland, 1983). Además, por si mismos los rotíferos y *Artemia* presentan actividades enzimáticas digestivas como ha sido detectado por Díaz *et al.* (1997) y García-Ortega *et al.* (1998) quienes consideran que la participación de enzimas digestivas exógenas es despreciable, y que ha sido corroborado en este estudio durante los ensayos *in vitro* y electroforéticos en comparación con las actividades cuantificadas en las larvas alimentadas.

Por otra parte, en relación a la desaparición de los componentes vitelinos, Ohkubo y Matsubara (2002), estudiaron la utilización secuencial de los aminoácidos libres, proteínas y lípidos vitelinos durante el desarrollo de los huevos y eleuteroembriones del lenguado barfin *Verasper moseri*, que es un pez de aguas frías (8 °C). Estos autores observaron una rápida desaparición de pre-aminoácidos libres durante los primeros 4 DDE, seguido de la desaparición de los aminoácidos libres esenciales y no esenciales desde el día 4 al 13 DDE, y finalmente, la disminución de lipovitulina y fosfolípidos unidos a lipoproteínas del día 16 al 21 DDE. Si se toma en cuenta esta utilización de los componentes vitelinos y los resultados de las actividades enzimáticas medidas en las larvas alimentadas y en inanición, no sería de extrañarse que en las larvas de la cabrilla arenosa la absorción de los componentes vitelinos se diera por acción de ciertas hidrolasas, que no necesariamente son digestivas, aunque si pancreáticas y que aún no han sido definidas en esta especie, pero que podría llevarse a cabo por algún tipo de catepsina L presente en la capa sinclear vitelina como ha sido reportado por Sire *et al.* (1994) en el lenguado. De ser cierto esto, sería lógico que la absorción se

realizara a una velocidad mucho mayor en la cabrilla arenosa, al ser un organismo de afinidad tropical. Una vez absorbidos, la mayoría de los componentes vitelinos y con la pigmentación de los ojos, apertura de la boca y el ano, se inicia lo que para algunos autores como Deplano *et al.* (1991) se denomina la fase lecitotrófica, donde se mezclan la alimentación endógena con la exógena, iniciando la secreción de enzimas pancreáticas digestivas que hidrolizarán los alimentos ingeridos.

Se han desarrollado dos teorías en cuanto a la utilización de enzimas digestivas exógenas provenientes de los alimentos vivos. La primera, que menciona que la participación de las enzimas digestivas provenientes del alimento vivo es muy alta (> 65 %) y que sin la adición de este tipo de alimento las larvas no tienen la capacidad de secretar sus propias enzimas (Jancarik, 1964; Dabrowski, 1984; Lauff y Hofer, 1984; Kolkovski *et al.*, 1993). Por ejemplo, Munilla-Morán *et al.*, (1990) calcularon que en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) la actividad amilasa contribuye del 15 al 27 % de la actividad total, del 43 al 60 % para la actividad proteasa, del 79 al 88 % de la actividad exonucleasa y del 84 al 94 % de la actividad lipasa. Por lo que las presas adicionadas a las larvas del rodaballo de 30 días de edad pueden contribuir desde 100 hasta 1000 veces la actividad de enzimas digestivas. Asimismo, Gawlicka *et al.* (2000) encontraron que la contribución exógena a la actividad amilasa de las larvas del lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* fue de 50 %. Aunque en este mismo estudio la participación de la actividad tripsina, lipasa y fosfatasa alcalina por parte de la *Artemia* fue solamente de 10 %.

En contra parte, la segunda teoría postula que las larvas presentan su propia maquinaria enzimática, la cual se manifiesta desde los primeros días de vida de las larvas, donde su expresión

está genéticamente programada, aunque la actividad se incrementa grandemente al agregar el alimento vivo, pero la participación de las enzimas exógenas es despreciable (Zambonino-Infante *et al.* 1996; Moyano *et al.*, 1996; Cahu y Zambonino-Infante 1997). Ha sido demostrado por Pedersen y Andersen (1992) que en larvas de *Clupea harengus* alimentadas con diferentes tipos de presas (copépodos) y microesferas, el contenido de tripsinógenos pancreáticos, tamaño del alimento y dimensiones de las presas, son los factores más importantes para la secreción de tripsinógenos, en especial en larvas que carecen de estómago. Los datos obtenidos en el presente estudio corresponden a lo observado para especies como la lubina y la dorada, donde se sabe que estas larvas poseen una capacidad enzimática innata suficiente para llevar a cabo la digestión del alimento, independientemente del aporte enzimático proveniente de las presas vivas (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Moyano *et al.*, 1996). Resultados similares han sido encontrados por Pedersen *et al.* (1987) y Pedersen y Hjelmeland (1988) quienes reportaron que solamente el 0.5% de la actividad tipo tripsina en larvas de sardina *Clupea harengus* fue derivada a partir de los copépodos. Así como en el estudio de Kurokawa *et al.* (1998) quienes estudiaron la contribución de proteasas de los rotíferos en la digestión de las larvas de la sardina *Sardinops melanoticus*, encontrando que el aporte de enzimas exógenas para las larvas de esta especie es despreciable (0.6 % de la actividad proteasa total).

Es por esto que debe considerarse, que aunque para algunas especies la contribución de enzimas exógenas es despreciable, su aporte puede ser necesario para activar una mayor secreción de las enzimas pancreáticas innatas de las larvas, además de que tanto el rotífero como la *Artemia*, pueden presentar cierto grado

de autohidrólisis que permiten poner a disponibilidad los nutrientes del alimento, como ha sido demostrado para la dorada y el dentón (Díaz *et al.*, 1997). Sin embargo, para las larvas de cabrilla arenera, se desconoce la participación real de las enzimas exógenas provenientes de la presas, por lo que se deberá profundizar aún más en este tipo de estudios donde se relacione la capacidad digestiva de los alimentos vivos y la cantidad de presas ingeridas diariamente por parte de las larvas.

5.4.2. Caracterización enzimática de proteasas.

Desde hace muchos años se han venido estudiando diversas enzimas digestivas en peces como la carpa dorada *Carassius auratus* y la lobina negra *Micropterus salmoides*, observándose que la acción de la pepsina se realiza a un pH ácido (3), mientras que las proteasas alcalinas, como la tripsina, funcionan a pH de 8.4. Sin embargo, este tipo de estudios no profundizaban más en la caracterización de este tipo de enzimas (Sarbahí, 1951). Recientemente, un gran número de estudios han permitido la caracterización de las enzimas digestivas de diversos organismos acuáticos, y este conocimiento detallado es muy útil para determinar el tiempo máximo en que las enzimas digestivas funcionan antes de que se manifieste una autohidrólisis (Connell, 1980) y para desarrollar aplicaciones de las enzimas de los organismos en la industria alimentaria (Dabrowski y Glogowski, 1977; Raa, 1990; Haard, 1992). Para el cultivo de peces, esta información puede ser útil en la selección de los ingredientes a emplearse en la formulación de alimentos adicionando enzimas digestivas de diversos organismos (Lan y Pan, 1993; Sabapathy y Teo, 1993; Moyano *et al.*, 1998; Alarcón *et al.*, 1998).

La caracterización de proteasas alcalinas de los juveniles de cabrilla

arenera mostraron que existen dos picos de actividad máxima, el primero entre 6 y 8, y el segundo en 10, estos picos pueden deberse a dos tipos de enzimas digestivas como ha sido observado por Glass *et al.* (1989) con el rodaballo. Es posible que el primer pico, corresponda a una de dos posibles causas, la primera es la acción de una serin proteasa tipo tripsina, quimotripsina o elastasa, que tenga su máxima actividad en ese intervalo. Lo anterior es factible ya que al revelar los zimogramas de actividad proteasa alcalina durante la ontogenia se observaron hasta 4 bandas con actividad (a partir de larvas de 12 DDE). En segundo lugar, existe la posibilidad de que ese primer pico corresponda a la acción de pepsina, ya que Díaz *et al.* (1998), han reportado una alta estabilidad de la pepsina de la dorada a condiciones alcalinas durante algún tiempo antes de perder su capacidad hidrolítica. Además, se debe considerar que para este ensayo se utilizó el paquete visceral de los juveniles de la cabrilla arenera y no órganos separados individualmente, por lo que este primer pico pudo haber sido influenciado por la acción de la pepsina. Al comparar estos resultados con los obtenidos para juveniles de varias especies de peces marinos se observó una gran similitud al pH en el que funcionan las proteasas alcalinas (9 a 10), como en el caso de la macarela *Scomber japonicus*, sabalote *Chanos chanos*, el rodaballo *Scophthalmus maximus* y la dorada *Sparus aurata* que presentaron doble pico de actividad (Ooshiro, 1971; Benitez y Tiro, 1982; Pyeun y Kim, 1986; Glass *et al.*, 1989; Alarcón *et al.*, 1998), lo cual se ha relacionado con la composición de aminoácidos, caracterizada por una alta proporción de residuos básicos, comparadas con las tripsinas de mamíferos (Haard, 1992). Asimismo, en el estudio de Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996a) con adultos del pez rojo *Sebastes mentella*, dorada *Sparus aurata* y rodaballo *Scophthalmus*

maximus, se caracterizaron las proteasas intestinales, las cuales mostraron que para las proteasas alcalinas el óptimo estuvo en 10 en las tres especies. Asimismo, este mismo óptimo fue encontrado para el piracanjuba *Brycon orbignyanus* (García-Carreño *et al.*, 2002).

La estabilidad a los cambios de pH de las proteasas alcalinas mostró alta resistencia a todos los pH evaluados y manteniendo su actividad relativa en más del 80 %, excepto en la preincubación a pH 2, donde se pierde más del 90 % de su actividad. Este resultado muestra que las proteasas alcalinas de esta especie, pueden hidrolizar las proteínas del bolo alimenticio previamente digeridas en el estómago, y que vienen a un pH ácido, resistiendo estas condiciones hasta que cambia a un pH alcalino en el intestino. Este mismo fenómeno ha sido observado con el salmón del Atlántico *Salmo salar*, donde se estudió la tripsina purificada, manteniendo su estabilidad desde 4.5 de pH (Outzen *et al.*, 1996), con el sabalote *Chanos chanos*, donde se mantuvo su actividad en más del 40 % desde un pH de 5 (Benitez y Tiro, 1982) y en el bacalao del Atlántico que permaneció estable desde un pH de 5 (Bjarnason *et al.*, 1993). Esto es indicativo de que la estructura de estas enzimas debe mantener una baja relación entre aminoácidos ácidos y básicos, lo que le confiere una alta estabilidad a pH ácido (Alarcón *et al.*, 1995).

La temperatura óptima de la actividad de proteasas alcalinas de los juveniles de cabrilla arenera fue de 55 °C, que es similar a las observadas para otras especies de peces como la lubina *Dicentrarchus labrax*, rodaballo *Scophthalmus maximus*, pez gato *Silurus glanis*, carpa herbívora *Hypophthalmichthys molitrix*, carpa común *Cyprinus carpio*, dorada *Sparus aurata*, dentón *Dentex dentex* y piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Alliot *et al.*, 1977; Jónás *et al.*, 1983; Glass *et al.*, 1989; Alarcón *et al.*, 1995; García-

Carreño *et al.*, 2002). Es obvio que al ser organismos poiquiloterms, no es posible que sus enzimas funcionen a su máxima capacidad si la temperatura de cultivo es más baja. Sin embargo, la actividad a menores temperaturas prevalece, por lo que esa disminución se compensa con un aumento en el tiempo de retención de los alimentos dentro del sistema digestivo con ayuda de los diferentes esfínteres, movimientos peristálticos y acción conjunta de sustancias como hormonas digestivas, que actúan de manera coordinada (Govoni *et al.*, 1986). Por otra parte, no resulta sorprendente que la estabilidad de estas proteasas a preincubaciones a diferentes temperaturas sea tan alta, ya que aparentemente existe un proceso de activación enzimática, que mejora la estructura terciaria o cuaternaria de las enzimas conforme aumenta la temperatura y facilita la unión del centro activo con el sustrato (Singleton y Amelunxen, 1973; Sabapathy y Teo, 1993). Aunque para la cabrilla arenera la preincubación a 65 °C, inactiva completamente a la enzima. Al comparar los resultados obtenidos con la cabrilla arenera y los del estudio de Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996a) se obtuvieron similitudes en los óptimos de temperatura, siendo los máximos de actividad entre 45 y 55 °C para las proteasas intestinales de pez rojo, rodaballo y dorada. De la misma manera, el estudio de Shin y Zall (1986) mostraron que las proteasas alcalinas del bacalao son altamente estables a altas temperaturas, aunque de preferencia no deben exceder los 60 °C. Asimismo, para el piracanjuba las proteasas alcalinas fueron estables hasta los 50 °C, disminuyendo su actividad en 60 % a 60 °C (García-Carreño *et al.*, 2002).

En el caso de las proteasas aspárticas (pepsina) el pH óptimo para los juveniles de cabrilla arenera fue de 2, siendo menor a los detectados para la lubina (pH 4.3), anguila (pH 5.2) y jurel

(4.0), y similares a los del lenguado del Atlántico (1.8), tilapia (2.0), perca (2.0), dorada (2.0), rodaballo (2.0), pez rojo (2.0) y piracanjuba (2.0), mismo que demuestra que la acción estomacal en estas especies es evidente (Fish, 1960; Takii *et al.*, 1985; Glass *et al.*, 1987; Caruso y Genovese, 1992; Eshel *et al.*, 1993; Munila-Morán y Saborido-Rey, 1996a; García-Carreño *et al.*, 2002). Estos autores comentan que la actividad de la proteasas ácidas mejora hasta que el pH del estómago ha disminuido; lo que se considera como una respuesta adaptativa que permite a la pepsina realizar la digestión completa de proteínas. Se debe resaltar un aspecto interesante, ya que se ha detectado la presencia de pepsina en el intestino de algunos peces, la cual lógicamente no se produce en ese tipo de tejidos. Sin embargo, se sugiere que la pepsina puede seguir hidrolizando la proteína en el intestino como una posible adaptación de organismos poiquiloterms, que denotan respuestas fisiológicas más lentas que los mamíferos, hasta que aumenta el pH e inicia la acción de proteasas alcalinas (Munila-Morán y Saborido-Rey, 1996a; Vu, 1983).

La estabilidad de las proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenera a los diferentes pH's mantuvo su actividad en más del 90 % hasta pH de 9, aunque disminuyó a 60 % a pH de 12. Estos resultados fueron similares a los observados para trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, bagre *Silurus glanis*, tilapia *Oreochromis niloticus*, lenguado sol *Solea solea*, rodaballo *Scophthalmus maximus*, halibut *Hippoglossus hippoglossus*, lubina *Dicentrarchus labrax*, dorada *Sparus aurata* y dentón *Dentex dentex*; donde nuevamente se pone en evidencia que los peces tienen una alta capacidad de digestión de proteínas, y a pesar de que el bolo alimenticio pase a la fracción intestinal, la capacidad hidrolítica de estas enzimas se mantiene por algún tiempo, aún con el incremento de pH

(Kitamikado y Tachino 1960; Jónás *et al.*, 1983; Yamada *et al.*, 1993; Glass *et al.*, 1989; Eshel *et al.*, 1993; Alarcón *et al.*, 1998).

De la misma manera que lo estudiado por Alarcón (1997) con dorada y dentón, se observó que la temperatura óptima para proteasas ácidas de los juveniles de la cabrilla arenera fue de 45 °C, aunque se debe recordar que este solamente es un parámetro operacional que no refleja la acción fisiológica de la pepsina a ciertas temperaturas, y de la misma manera que las proteasas alcalinas, el tiempo de retención del alimento en el estómago, aún a temperaturas menores, favorecerá la hidrólisis de proteínas dietarias. Asimismo, se detectó una menor estabilidad a los cambios de temperatura, lo cual también fue observado para la anguila japonesa *Anguilla japonica*, jurel *Seriola dumerilli*, lubina *Dicentrarchus labrax* y piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Takii *et al.*, 1985; Caruso y Genovese, 1992; Eshel *et al.*, 1993; García-Carreño *et al.* 2002), donde se ha manejado que a mayores temperaturas existe una desnaturalización de la enzima, sufriendo modificaciones estructurales que disminuyen o inactivan su capacidad de acoplarse al centro activo al sustrato (Díaz *et al.*, 1997). Además, se ha observado una diferencia de 10 °C para los óptimos entre proteasas alcalinas y ácidas, como en la dorada *Sparus aurata*, dentón *Dentex dentex*, Boreogadus *saida*, tilapia *Oreochromis niloticus*, pez perro *Scyliorhinus canicula* y trucha *Onchorhynchus mykiss* (Arunchalam y Haard 1985; Yamada *et al.*, 1993; Guerard y Le Gal 1987; Torrissen, 1984). En el estudio de Munilla-Morán y Sabarido-Rey (1996a) se obtuvieron óptimos entre 35 a 45 °C para los extractos estomacales de las tres especies anteriormente mencionadas.

A modo comparativo se muestra la siguiente tabla, en la cual se engloba el efecto de varios inhibidores sobre la

actividad proteasa en diferentes peces (en porcentaje de inhibición). Además se incluyen los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 9).

De esta manera, el estudio con inhibidores, tanto *in vitro* como por medio de zimogramas en los juveniles de la cabrilla arenera, mostraron las mismas 4 bandas con actividad proteolítica que en larvas de 12 DDE en adelante, detectadas durante la ontogenia de proteasas alcalinas. Este número de bandas es menor a la cantidad observada para especies como la dorada y el dentón con 5 y 8 respectivamente (Alarcón *et al.*, 1998), la trucha arcoiris y el salmón con 7-9 y 6-8 respectivamente (Dimes *et al.*, 1994a), el pez disco *Symphysidon aequifasciata* con 8 (Chong *et al.*, 2002b), el piracanjuba *Brycon orbignyanus* con 8 bandas (García-Carreño *et al.*, 2002), pero igual al número de bandas observada en la carpa común *Cyprinus carpio* con 4 (Cohen *et al.*, 1981). Sin embargo, las proteasas alcalinas de la cabrilla arenera son muy resistentes a los inhibidores probados, ya que el mayor porcentaje de inhibición fue dado por la acción del EGTA y EDTA disminuyendo en un 35 y 40 % la actividad relativa respectivamente, siendo similar a lo observado para la dorada y el dentón, donde la inhibición con EDTA fue de 33.6 y 29.8 %, pero bastante mayor que con el EGTA donde se obtuvieron porcentajes de inhibición de 6.5 y 17.0 % para la dorada y el dentón respectivamente (Alarcón, 1997). Resultados similares fueron obtenidos por Dimes *et al.* (1994a), con trucha y salmón, donde se determinó una inhibición con EDTA de 20.13 y 11.17 % y de 24.36 y 13.03 % en EGTA respectivamente. En el mismo contexto, Chong *et al.* (2002b), detectaron una inhibición del 50 % al utilizar EDTA con los extractos intestinales en adultos del pez disco y 30 % para el piracanjuba (García-Carreño *et al.*, 2002), por lo que se puede concluir que una buena parte

de las proteasas alcalinas de los juveniles de la cabrilla arenera pertenecen al grupo de las metalproteasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas). Esto concuerda con lo observado en el zimograma de inhibición, donde este quelante elimina 2 de las 4 bandas de actividad proteolítica en los juveniles de la cabrilla arenera.

Asimismo, dependiendo de la especie, el grado de inhibición puede ser mayor como fue detectado en el estudio de Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996a), donde la inhibición con el EDTA fue de 80.5, 3.3 y 75.3 % en los extractos intestinales del pez rojo, dorada y rodaballo respectivamente.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición (%) de proteasas digestivas presentes en diferentes peces usando inhibidores específicos (Tomado de Moyano *et al.*, 1998, modificado).

Enzima	Especie	PMFS	SBT1	TLCK	CHYMOST	TPCK	EDTA	EGTA	Pepstatina A
P	<i>Scylorhinus canicula</i>	-	-	-	-	-	-	-	100
PAC	<i>Sparus aurata</i>	33	24	17	-	62	85	-	100
PAC	<i>Sparus aurata</i>	7	12	-	-	-	-	-	99
PAC	<i>Dentex dentex</i>	9	9	-	-	-	-	-	99
PAC	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	95
Q	<i>Gadus morhua</i>	100	44	1	100	100	4	14	-
Q	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	-	-	-	-	13 con ZPCK	-	-	-
T	<i>Gadus ogac</i>	68	98	-	-	-	-	-	-
T	<i>Gadus morhua</i>	65	95	-	-	-	-	-	-
T	<i>Tautoglabrus adspersus</i>	59	70	-	-	-	1	-	1
T	<i>Salmo salar</i>	100	-	-	-	-	2	-	-
PAL	<i>Scomber japonicus</i>	-	58	-	-	-	-	-	-
PAL	<i>Gadus morhua</i>	45	-	11	-	19	-	-	-
PAL	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	44	32	30	-	24	13	28	-
PAL	<i>Sparus aurata</i>	46	95	41	-	42	97	-	9
PAL	<i>Sparus aurata</i>	30	55	20	50	27	40	7	-
PAL	<i>Dentex dentex</i>	45	41	6	41	26	30	17	-
PAL	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	17	20	17	-	-	35	40	-
PAL	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	-	-	-	10 con OVO	-	-	-	-

P: Pepsina; PAC: Proteasa ácida; Q: Quimotripsina; T: Tripsina; PAL: Proteasas alcalina. PMSF: floruro de fenilmetilsulfonil; SBT1: Inhibidor tripsina de soja; TLCK: tosil-lisina clorometil quetona; CHYMOST: chimostatina; OVO: ovoalbúmina; TPCK: tosil-fenilalanina clorometil quetona; ZPCK: N-CBZ-L- fenilalanina quetona; EDTA: ácido tetraacético de etilenediamina; EGTA: N,N'-tetra acetato de etileno glicol bis (éter β -aminoetiltetra). Las líneas indican que ese inhibidor no tuvo efecto sobre la actividad.

Por otra parte, el SBT1 y TLCK solamente disminuyeron en un 20 % la actividad residual de los juveniles de la cabrilla arenera, siendo mucho menores a los detectados para el pez disco, donde se inhibió la actividad en 30 y 50 % al usar estos inhibidores respectivamente. Asimismo, para la trucha y el salmón también se calcularon reducciones del 49 y 32 % usando SBT1 y del 41.78 y 29.89 % usando TLCK respectivamente (Dimes *et al.*, 1994a). De acuerdo a Eshel *et al.* (1993), la contribución de la tripsina en peces

carnívoros es de 40 a 50 %, como se ha reportado para la dorada (Moyano-López *et al.*, 1999), lo cual también ha sido observado en el bacalao *Gadus morhua*, donde se ha detectado una actividad residual del 69 % con el SBT1 y de 54.3 % con TLCK (Shin y Zall, 1986). En el estudio de Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996a), la acción de inhibición del SBT1 fue de 26.6, 4.6 y 15 %, mientras que la del TLCK fue de 56.9, 58.9 y 69.2 en los extractos intestinales de pez rojo, dorada y rodaballo, respectivamente. Sin embargo, en especies como el pez gato

Parasilurus asotus la inhibición de la actividad fue de un 100 % (Yoshinaka *et al.*, 1984). De acuerdo con estos resultados, se puede asumir que en el caso de la cabrilla arenera, aunque se ha reportado que es de hábitos alimenticios carnívoros (Ferry *et al.*, 1997), tiende a adaptarse a su entorno y consumir varios tipos de alimentos, por lo que podría considerarse como un omnívoro oportunista (zooplancófago facultativo en el caso de las larvas), donde la contribución de enzimas tipo tripsina se encuentra entre 20 y 30 % de la actividad de proteasas alcalinas totales, presentando un número similar de bandas con actividad caseinolítica que en la dorada. Asimismo, al aplicar los inhibidores en los zimogramas, la disminución de las bandas de actividad proteolítica de la dorada fue de 4 a 2 con SBT1 y ninguna con TLCK, en el dentón de 8 a 3 con SBT1 y de 8 a 7 con TLCK, siendo muy similar a lo detectado en la cabrilla arenera, donde se inhibieron 2 de las 4 bandas con el SBT1 y una de las 4 bandas con el TLCK, por lo que se denota una baja sensibilidad a inhibidores de origen vegetal (como el SBT1, proveniente de la soya) para todas estas especies. Además se debe resaltar que para el pez disco ambos inhibidores solamente eliminaron una de las 8 bandas, por lo que se concluye que esta especie tiene una alta capacidad digestiva, lo que permitiría utilizar ingredientes no convencionales en la elaboración de dietas completas (Chong *et al.*, 2002b). Es por esto, que en el momento de la selección de ingredientes para la fabricación de alimentos para peces marinos, se deberá poner mucho cuidado, ya que dependiendo del tipo de ingrediente y su fabricación (proceso de eliminación de inhibidores) podría afectar de manera importante el crecimiento y la supervivencia de los peces en cultivo (Moyano-López *et al.*, 1999).

Para los extractos enzimáticos de la dorada la inhibición con PMSF (24.3 %) y ZPCK (26.2 %) fueron ligeramente

mayores a los calculados para la cabrilla arenera (20 y 18 %, respectivamente); mientras que para el dentón los porcentajes de inhibición fueron mayores (44.5 y 36.1 %) (Alarcón *et al.*, 1998). Para el piracanjuba se obtuvo 26 % de inhibición con el ZPCK (García-Carreño *et al.*, 2002), y en el caso del pez disco, el porcentaje de inhibición con PMSF fue de 42 % (Chong *et al.*, 2002b), siendo mayor que en la cabrilla arenera. En el estudio de Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996a), la acción inhibitoria del PMSF fue de 53.7, 56.3 y 88.5 % en los extractos intestinales del pez rojo, dorada y rodaballo, respectivamente. En el caso del bacalao la inhibición fue mucho mayor, alcanzando 63.3 % (Shin y Zall, 1986) y 56 % para el pez gato *Parasilurus asotus* (Yoshinaka *et al.*, 1984). Comparando nuestros resultados al utilizar los zimogramas, se observó la desaparición de una de las 4 bandas de actividad con ambos inhibidores para los juveniles de la cabrilla arenera, lo cual concuerda con lo observado para la dorada con la desaparición de 2 de las 4 bandas con ambos inhibidores; para el dentón con la eliminación de 5 de las 8 bandas con PMSF y una de las 8 con ZPCK. Contrariamente a este resultado, se observó un fuerte efecto del PMSF con la desaparición de 6 de las 8 bandas para el pez disco (Chong *et al.*, 2002b). Sin embargo, se debe estar consiente que estos resultados no son concluyentes, ya que sería necesario modificar las condiciones del ensayo para confirmar la alta resistencia a este tipo de inhibidores (aumentar de la concentración del inhibidor o incrementar el tiempo de incubación con el inhibidor). Asimismo, queda de manifiesto que se requeriría profundizar más en el estudio de proteasas para esta especie, ya que aparentemente el zimograma demostró que existen no solamente tripsinas y quimotripsinas, sino también otro tipo de proteasas que son resistentes a la acción de la mayoría de los inhibidores. Este estudio abre una puerta para probar el

uso de harinas de origen vegetal en la formulación y elaboración de dietas para engorda de esta especie.

Por otra parte, en el caso de proteasas estomacales, se han detectado hasta cinco tipos de zimógenos que dan origen a este tipo de enzimas y que actúan durante el proceso de digestión (pepsinógeno A, B, F, progastricina y proquimosina), aunque en el caso de la mayoría de los vertebrados superiores se han detectado mayormente el pepsinógeno tipo A y la gastricina (Kageyama, 2002). Para la cabrilla arenera, al realizarse la caracterización se observó una sola banda de actividad y al realizar la inhibición utilizando la pepstatin A, tanto en los ensayos *in vitro* como electroforéticos, la actividad enzimática disminuyó en un 95 % y la banda desapareció totalmente. Esto concuerda con lo observado por Munilla-Morán y Saborido-Rey (1996a), quienes detectaron la inhibición del 100 % utilizando pepstatin A en los extractos estomacales del pez rojo, dorada y rodaballo. Además, comparando estos resultados con los obtenidos para el piracanjuba por García-Carreño *et al.* (2002), también se observó una sola banda de actividad pepsina y que fue inhibida con pepstatin A en un 90 %, con lo cual se confirma que el mayor porcentaje de pepsina presente en estos peces es del tipo A. Si se toman en cuenta estas características, es muy posible que la pepsina perteneciente a la cabrilla arenera sea del tipo A, aunque se requiere profundizar más en su estudio a fin de conocer si existe algún otro tipo de enzima aspártica presente en esta especie.

5.5. CONCLUSIONES.

Ontogenia enzimática.

Las larvas de la cabrilla arenera presentan desde sus primeros días de vida una maquinaria enzimática primaria que le permite hidrolizar los componentes vitelinos y que va mejorando conforme la larva se transforma a juvenil, lo cual le permite digerir los diferentes combustibles una vez iniciada la alimentación exógena.

De las proteasas digestivas evaluadas en este estudio, las alcalinas presentan un incremento gradual desde el día 2 hasta el día 12 DE (pico de actividad máxima), para después disminuir paulatinamente y se sincroniza con el inicio de la actividad de proteasas ácidas en ese mismo día, la cual supera a las proteasas alcalinas en el día 25 DE.

Las esterases no específicas y/o lipasas fueron detectadas desde la apertura de la boca (2 DDE), incrementando rápidamente su actividad, alcanzando su máximo a los 9 DDE, lo que le permite a la larva aprovechar grandemente los lípidos dietarios del glóbulo de aceite y los provenientes de las presas vivas. Sin embargo, su capacidad para digerir lípidos es aparentemente restringida a ácidos grasos de cadena corta, por lo que es probable que durante los primeros días de vida actúen primordialmente esterases no específicas, y no es sino hasta el día 12 ó 15, que empiezan a funcionar mayormente lipasas verdaderas, lo que se equipara fuertemente con la funcionalidad del estómago.

Las larvas de la cabrilla arenera, mostraron una capacidad amilasa mayor que otras especies de peces marinos, que no parece estar totalmente relacionada con el tipo de presa, por lo que es muy probable que esta actividad esté programada desde la eclosión de las larvas.

Esta especie puede ser considerada como un zooplanctófago

facultativo, capaz de consumir y digerir una amplia variedad de presas incluyendo alimentos con ciertas proporciones de carbohidratos.

Las fosfatasas presentaron un pico máximo en el día 12, lo que está relacionado no solamente con la funcionalidad del estómago, sino probablemente también con la maduración de los enterocitos del intestino. Sin embargo, se requiere profundizar más en este tipo de estudios y su relación con la capacidad de absorción de nutrientes.

Los alimentos vivos tienen su propia maquinaria enzimática, por lo que no es posible descartar la participación de enzimas exógenas provenientes del alimento vivo. Sin embargo, las diferencias entre las bandas de actividades enzimáticas, parecen no corresponder totalmente a las observadas en las larvas, luego entonces es probable que el aporte enzimático de las presas no sea tan relevante para la cabrilla arenera, además que las enzimas digestivas fueron detectadas desde los primeros días de vida de las larvas en inanición.

Todos estos resultados permiten concluir que las larvas de la cabrilla arenera son organismos precoces, que tienen un equipamiento enzimático completo, y en la medida en que se realizan todos los cambios morfofisiológicos, cambia su capacidad digestiva al tipo monogastro, donde que el estómago se convierte en el principal órgano que realiza la digestión y el intestino el que realiza principalmente la función de absorción de nutrientes a partir del día 12, llegando a su máximo el día 25 DE. De esta manera, es posible intentar la sustitución de presas vivas por microdietas durante este intervalo de tiempo, aunque se deberá evaluar si su utilización mejorará el crecimiento y la supervivencia de las larvas en comparación con la alimentación con presas vivas.

Las características operacionales de las proteasas en los juveniles de la cabrilla arenera fueron similares a las observadas en otras especies de peces, no solamente marinos, sino también de agua dulce. Asimismo, esta especie parece poseer enzimas tipo tripsina y quimotripsina parecidas a las de otras especies, aunque se observaron propiedades interesantes en cuanto a la resistencia a los inhibidores, por lo que es posible que existan otro tipo de enzimas digestivas más resistentes que las detectadas en otros organismos marinos y terrestres.

Considerando toda la información obtenida de esta primera parte de la tesis, la formulación y fabricación de dietas inertes para larvas y juveniles se vislumbra como una alternativa viable. Sin embargo, se deberá profundizar en qué tipo de dietas se tendrán que utilizar dependiendo del período de vida que se trate. Ahora se sabe que los juveniles tienen una alta capacidad para hidrolizar proteínas. Las larvas presentan un equipamiento enzimático completo desde el día 12, aunque no alcanza su máxima capacidad, y en el día 25 DE esta capacidad es similar a la de los juveniles, por lo que a partir de esta edad pueden ser considerados como tales, al menos desde el punto de vista del sistema digestivo. Esto da pie a evaluar ingredientes convencionales y no convencionales, para asegurar que los nutrientes necesarios lleguen a la larva de manera eficiente y le faciliten su ingestión, digestión y absorción.

Caracterización de proteasas.

La clasificación de proteasas alcalinas de la cabrilla arenera se puede considerar similar a las de otros peces marinos como la dorada, el dentón y la lubina, presentando parámetros operacionales de pH y de temperatura óptimos alrededor de 9 y 11 de pH y de 50 a 55 °C. Un aspecto interesante demostrado en este estudio, es la peculiar alta estabilidad que muestran las

proteasas alcalinas a los diferentes valores de pH y temperatura, por lo que consideramos que pueden existir otro tipo de enzimas digestivas (tipo tripsina, quimotripsina y catepsinas), las cuales pueden ser diferentes a las observadas en otras especies.

Por medio de zimogramas e inhibidores se pudo determinar que la cabrilla arenera, cuenta con endopeptidasas, similares en peso molecular a las tripsinas y quimotripsinas de otros organismos marinos (22 a 25 kDa) y exopeptidasas que son muy resistentes. Es posible que un buen porcentaje de enzimas digestivas correspondan a exopeptidasas, ya que al usar los quelantes se observó la mayor inhibición, comparadas con los demás inhibidores. Asimismo, las proteasas alcalinas de la cabrilla arenera son más resistentes a inhibidores como el SBT1 y el PMSF que otras especies de peces e inclusive mamíferos terrestres, por lo que es probable que ingredientes de origen vegetal puedan ser usados en la fabricación de dietas para la alimentación de esta especie, al menos en el período juvenil.

Para la pepsina, se encontraron ciertas similitudes en su óptimo de pH y temperatura (2 y 5, 35 y 45 °C), a lo observado en otras especies marinas. De esta manera, se observó la misma diferencia de 10 °C de temperatura óptima entre las proteasas alcalinas y las ácidas que han sido detectadas en otras especies de peces.

La estabilidad de la pepsina a los cambios de pH y temperatura fueron similares a las observadas en otros peces, al ser menos estables a este tipo de fluctuaciones que las proteasas alcalinas, además que solamente se identificó una sola banda proteínica con actividad digestiva ácida, y que fue inhibida casi totalmente con la peptatín A, por lo que es muy probable que solamente exista un solo tipo de proteasa ácida digestiva en la cabrilla arenera.

6. ESTUDIO DE DIGESTIBILIDAD “*IN VITRO*” DE INGREDIENTES PROTEÍNICOS DE ORIGEN ANIMAL EN JUVENILES DE LA CABRILLA ARENERA.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar la digestibilidad “*in vitro*” de diversos ingredientes proteínicos de origen animal en juveniles de la cabrilla arenera.

Seleccionar los ingredientes proteínicos con el mayor grado de hidrólisis, concentración y liberación de aminoácidos para utilizarse en el diseño de dietas inertes para la alimentación de larvas.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.2.1. Obtención de juveniles.

Para este estudio se obtuvieron un total de 350 juveniles de cabrilla arenera a partir del larvicultivo descrito en la primera parte (Sección 5.2.1), para lo cual se alimentaron por otros 15 días con una dieta inerte para destete (Alvarez-González, 1999), hasta que tuvieron una edad de 45 DDE (0.3 g de peso promedio). Estos juveniles fueron anestesiados con MS-222, enjuagados con agua destilada, liofilizados y congelados a – 50 °C, hasta su posterior análisis.

6.2.2. Preparación de los extractos de los juveniles.

Previo a la extracción de proteínas solubles, los juveniles fueron disectados, eliminando la parte cefálica, la parte caudal del cuerpo (desde el ano hacia atrás) y la parte superior del cuerpo a la altura de las vértebras, utilizándose exclusivamente la parte visceral de los juveniles para hacer extractos multienzimáticos. La extracción de proteínas del paquete visceral se realizó de los 350 juveniles homogenizándolos en agua destilada (300 mg/ml), por medio de un disruptor de tejidos y centrifugándolos a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se recobró la fracción soluble y se dividió en dos tipos de fracciones, a la mitad de la fracción obtenida, se le ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico (0.1 M) para activar exclusivamente las proteasas ácidas, mientras que a la otra fracción se le ajustó el pH a 8 con dióxido de sodio (0.1 M) para activar las proteasas

alcalinas. Ambas fracciones fueron dispensadas en alícuotas de 1 ml y almacenadas a – 20 °C hasta su utilización.

Para el cálculo de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utilizó la técnica descrita en la sección 5.2.3. La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las ecuaciones descritas en la sección 5.2.4. La actividad de proteasas ácidas y alcalinas se calculo en función de las técnicas descritas en la sección 5.2.5.

El número de unidades de actividad utilizadas en cada ensayo se calculó a partir de los resultados de actividad proteolítica presente en los extractos de los juveniles de la cabrilla arenera, utilizando 20 U/mg de proteína para los extractos estomacales y 200 U/mg de proteína para los extractos intestinales.

6.2.3. Selección de ingredientes.

La selección de los ingredientes se realizó en base a un estudio previo en reproductores de la cabrilla arenera (datos no publicados). En este estudio se probaron ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal, los cuales sirvieron de base para el presente estudio. Como el objetivo de este estudio es determinar el grado de hidrólisis de diversos ingredientes que permitan elaborar dietas inertes para la alimentación de larvas, se restringió exclusivamente a los de origen animal los cuales presentan las siguientes características:

1.- Caseína bovina: La cual es originaria de ICN grado electroforesis y sirve como referencia de máxima hidrólisis, presenta

un valor de proteína cruda de 90% (en base seca).

2.- Hidrolizado proteínico de pescado comercial: El cual es originario de Francia y fue elaborado por hidrólisis química de proteína de pescado, contiene aproximadamente un 70 % de proteína cruda.

3.- Harina de sardina: La cual fue fabricada en la Conservera San Carlos, BCS, México y adquirida en la empresa PIASA, La Paz, México. Este ingrediente contiene un 70 % de proteína cruda.

4.- Harina de calamar: La cual fue fabricada en la Conservera Santa Rosalía, BCS, México y adquirida en la empresa PIASA, La Paz, México. Este ingrediente contiene un 70 % de proteína cruda.

5.- Harina de langostilla: Elaborada en la Conservera San Carlos por investigadores del CIBNOR. Este ingrediente contiene aproximadamente un 38 % de proteína cruda.

6.- Harina de sangre de res: Este ingrediente fue adquirido de la compañía PROACUA en España. Contiene aproximadamente un 95 % de proteína cruda.

6.2.4. Determinación del grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis (GH%) se determinó utilizando un pH-stat (Metrohm, Titrino 718, Suiza). Para ello se preparó una solución acuosa de materia prima que contuvo 8 mg de proteína/ml en un vaso de 5 ml empleando una modificación de la metodología propuesta por Saunders *et al.* (1972). A continuación se le ajustó el pH a 3.5 con HCl 0.1 N y se mantuvo a 37 °C durante 15 min antes de la adición de la preparación enzimática a pH 3. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua (500 rpm) a 37 °C durante 15 minutos. Una vez concluida la reacción ácida, se aumentó el pH a 8 con NaOH 0.1 N y se mantuvo a 37 °C durante 15 minutos para después adicionar la preparación enzimática a pH 8. La mezcla

de reacción se mantuvo en agitación continua (500 rpm) y a 37 °C durante 45 minutos. El grado de hidrólisis se calculó a partir del volumen de NaOH 0.1 N necesario para mantener el pH a 8.0, una vez concluida la digestión alcalina.

Asimismo, se valoró el nivel de autohidrólisis de los diferentes ingredientes en ausencia de las proteasas digestivas. En todos los casos se determinó el valor de la hidrólisis (GH) en ausencia del extracto enzimático, que fue sustituido por un volumen equivalente de agua destilada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El método para la determinación del grado de hidrólisis se basa en el número de enlaces peptídicos rotos a lo largo del proceso de hidrólisis enzimática. El resultado de la acción de una proteasa sobre este enlace es la formación de un grupo amino y otro carboxilo libres que podrán ser más o menos ionizados en función del pH de la reacción. En el caso concreto del intervalo de pH 5.0-6.0, hay un equilibrio entre los protones captados y cedidos que determinarán la invariabilidad del pH de la mezcla. Sin embargo, por debajo de pH 3.1-3.6 los grupos aminos están totalmente protonados, con lo que la ruptura de un enlace peptídico se produce un incremento en el pH de la mezcla de hidrólisis. Por el contrario, a valores de pH entre 7.5 y 8.0 los grupos carboxilos libres están totalmente disociados, y como consecuencia se produce una acidificación del medio de reacción. En esta última premisa se basa en el principio químico de la técnica de pH-stat. Cuando la hidrólisis tiene lugar a pH neutro, la disociación de los grupos carboxilos liberados disminuye el pH de la mezcla de reacción, de este modo la cantidad de base (NaOH) consumida para mantener el pH constante es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos hidrolizados, es decir, al grado de hidrólisis (GH).

El grado de hidrólisis, se expresó como el porcentaje del número de

enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}), se

calculó mediante la siguiente ecuación:

Cálculo del grado de hidrólisis de una reacción enzimática.

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Siendo h; el número de enlaces peptídicos hidrolizados.

h_{tot} ; el número de enlaces peptídicos totales del sustrato proteico

$$h = V_b \times N_b \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{MP}$$

Siendo:

V_b ; el consumo de base en ml

N_b ; la normalidad de la base

α ; la constante de disociación de los grupos α -NH₂

MP; la masa de proteína en la mezcla de reacción

h; número de enlaces peptídicos hidrolizados.

Durante la determinación del grado de hidrólisis de las materias primas con los extractos enzimáticos de los peces, se colectaron muestras (40 μ l) del ingrediente hidrolizado de la siguiente manera.

1.- Digestión ácida. Al adicionar al extracto estomacal se tomaron muestras a los 0 (i) y 900 (f) segundos durante la hidrólisis ácida.

2.- Digestión alcalina. Al adicionar el extracto intestinal se tomaron muestras a los 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2700 segundos.

6.2.5. Análisis mediante técnicas electroforéticas.

De los 40 μ l, 20 μ l se mezclaron a partes iguales con tampón de muestra (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 4% (P/V) SDS; 10% (V/V) 2- β -mercaptoetanol; 20% (V/V) glicerol; 0.04% (P/V) azul de bromofenol) y se calentaron durante 5 min a 100 °C. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las electroforesis (SDS-PAGE) se desarrollaron de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli

(1970), usando geles de poliacrilamida al 10 % y cada pocillo contendrá de 35-40 μ g de proteína. Las electroforesis se desarrollaron a voltaje constante de 100 volts por gel durante 45 min y a 5°C. A continuación, los geles se fijaron durante 15 min en una solución de TCA al 12% y seguidamente se tiñeron durante una noche en otra solución compuesta de 0.1% de azul brillante de Coomassie (BBC R-250) en metanol-ácido acético-agua destilada (50:20:50). Para desteñirlos se utilizó una solución de metanol-ácido acético-agua destilada (35:10:55). Una vez desteñidos se hidrataron en agua destilada, para ser digitalizados.

6.2.6. Análisis de aminoácidos totales.

Los otros 20 μ l de la solución acuosa se fijaron con 20 μ l de una solución de tricloro acético (TCA) al 12 % para realizar los análisis de aminoácidos libres totales de acuerdo a la técnica propuesta por Church *et al.* (1983). Esta técnica se basa en la unión de la parte amino terminal con el reactivo de o-phthaldialdehído (OPA). Para esto se agregaron los 20 μ l de la muestra con el reactivo OPA, agitándose vigorosamente y leyendo su absorbancia a 340 nm. Se

realizó una curva patrón con l-leucina (0.5 mg/ml) con concentraciones crecientes de 0 a 20 µg/ml para la determinación de la cantidad de aminoácidos libres totales en las muestras. Estos ensayos fueron realizados por triplicado.

6.2.7. Análisis estadístico.

A todos los análisis se les hicieron pruebas de normalidad y homoscedasticidad; en los casos donde estos postulados se cumplieron, se aplicaron análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tuckey. En los casos donde no se cumplieron los postulados, se aplicaron prueba de Kruskal-Wallis y pruebas a posteriori de Tuckey no paramétricas. Las tasas de liberación de aminoácidos fueron calculadas a partir del ajuste al modelo lineal $y = a + bx$, las pendientes fueron comparadas por medio de un análisis de covarianza, y además se realizó la prueba de Tuckey para detectar las diferencias significativas ($p < 0.05$). Para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v 6.

6.3. RESULTADOS.

análisis químicos proximales y de energía bruta de los ingredientes de interés (Tabla 10).

6.3.1. Digestibilidad *in vitro* de ingredientes.

Previo a la determinación del grado de hidrólisis (GH), se le realizaron

Tabla 10. Análisis químico proximal y energía bruta de los ingredientes utilizados en los estudios de digestibilidad "*in vitro*" para juveniles de cabrilla arenosa.

g/100 g materia seca (excepto humedad)	C ¹	HP ² (CPSP 2000)	Hsar ³ (HS0101-1)	HL ⁵ (HL9804)	HC ³ (HC0101-1)	HS ⁴ (HSAN0201-1)
Proteína	90	73.18 ± 0.12	69.86 ± 0.07	38.15 ± 0.01	71.62 ± 0.11	95.49 ± 0.13
Extracto etéreo	n.a.	20.49 ± 0.23	5.41 ± 0.04	2.99 ± 0.06	5.04 ± 0.10	1.00 ± 0.04
Ceniza	n.a.	5.14 ± 0.02	15.69 ± 0.32	39.07 ± 0.16	14.62 ± 0.09	1.81 ± 0.01
Fibra	n.a.	-	0.28 ± 0.03	12.1 ± 0.23	1.74 ± 0.05	-
ELN	n.a.	1.19	8.76	7.69	7.28	1.70
Energía (cal/g)	n.a.	5972 ± 2.61	5047 ± 9.05	3385 ± 5.24	5632 ± 7.65	n.a.
Humedad	1	1.99 ± 0.06	5.63 ± 0.02	3.95 ± 0.03	10.6 ± 0.10	6.00 ± 0.15

C: Caseína, HP: Hidrolizado proteínico de pescado, Hsar: Harina de sardina, HL: Harina de langostilla, HC: Harina de calamar y HS: Harina de sangre de res.

n.a. no analizado.

¹ICN; ²CPSS de Noruega; ³PIASA, La Paz, México; ⁴Proaqua S.A., España; ⁵CIBNOR-Conservera San Carlos.

Las diferentes harinas probadas utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa, mostraron diferencias importantes en la capacidad de hidrolizar las proteínas presentes en estos ingredientes. La caseína fue utilizada como control, al ser una proteína proveniente de la leche, la cual ya ha sido previamente tratada por procesos químicos para su purificación, lo que le confiere una alta hidrólisis. Esta proteína es la que mostró el mayor grado de hidrólisis (GH) y porcentaje de digestibilidad *in vitro* (100 %), siendo significativamente mas altos ($p < 0.05$) comparado al resto de los ingredientes probados. La harina de sangre de res, mostró buenos niveles de GH y 78 % de

digestibilidad, no siendo significativamente diferente al obtenido con la harina de langostilla ($p > 0.05$). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos tres ingredientes anteriormente mencionados en comparación con la harina de calamar y el hidrolizado comercial de pescado, los cuales presentaron menores niveles de GH y porcentaje de digestibilidad (60 y 54 % respectivamente). El nivel más bajo de GH y porcentaje de digestibilidad fue el obtenido para la harina de sardina, aunque esa diferencia no fue significativa en comparación con el hidrolizado de pescado comercial, pero sí con el resto de los ingredientes analizados (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación del grado de hidrólisis (GH %) y porcentaje de digestibilidad *in vitro* de diversos ingredientes de origen proteínico, utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (Promedio $\pm$ desv. est., n=3).

Ingrediente	GH (%)	% Digestibilidad
Caseína ¹	13.3 $\pm$ 0.3 ^a	100.0 $\pm$ 2.3 ^a
Hidrolizado de pescado ² (CPSP 2000)	7.2 $\pm$ 0.7 ^{cd}	53.9 $\pm$ 5.1 ^{cd}
Harina de sardina ³ (HS0101-1)	6.5 $\pm$ 1.0 ^d	48.5 $\pm$ 7.6 ^d
Harina de langostilla ⁵ (HL9804)	9.8 $\pm$ 0.6 ^b	73.8 $\pm$ 4.6 ^b
Harina de calamar ³ (HC0101-1)	8.0 $\pm$ 0.5 ^c	59.8 $\pm$ 3.5 ^c
Harina de sangre de res ⁴ (HSAN0201-1)	10.4 $\pm$ 0.2 ^b	77.9 $\pm$ 1.2 ^b

Superíndices diferentes entre líneas indican diferencias significativas (P<0.05).

6.3.2. Análisis electroforéticos.

El análisis electroforético demostró que los ingredientes de origen animal se degradan de forma muy variable, aunque en general pasan por dos procesos importantes. El primero, donde proteínas de alto y mediano peso molecular son hidrolizadas parcialmente a péptidos de peso molecular menor que los originales por la acción de la pepsina y el pH ácido (3.5). El segundo proceso

se lleva a cabo sobre estos péptidos de menor peso, los cuales son degradados lentamente por acción de las enzimas presentes en el intestino, tanto para recortar aún más los péptidos medianos como para liberar aminoácidos, lo cual se constató al ir disminuyendo el número de bandas proteínicas, que prácticamente desaparecen a los 2700 segundos (Fig. 39).

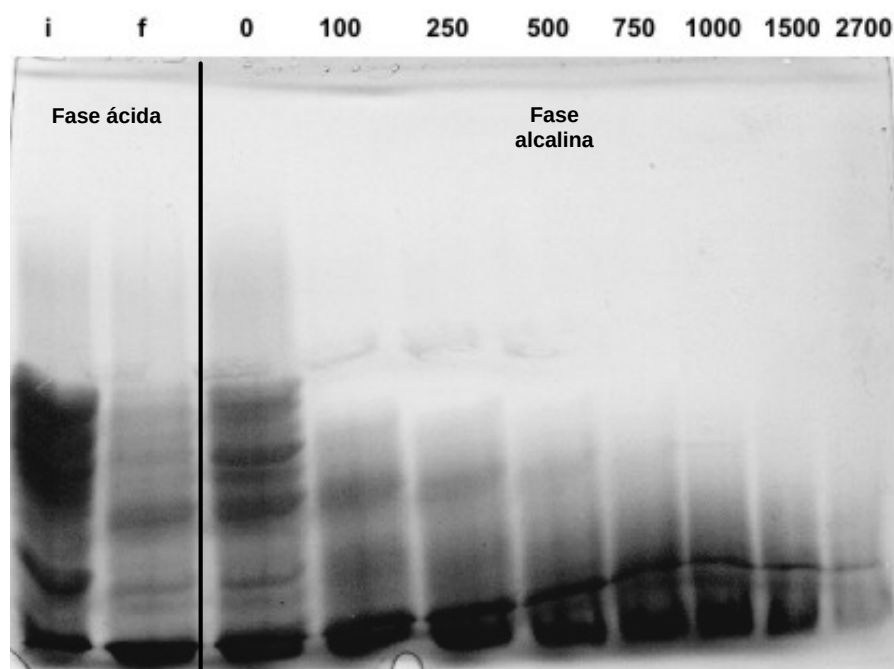


Figura 39. Proceso de digestión de la caseína por acción de los extractos enzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera. i: Inicio de la hidrólisis ácida (tiempo 0); f: Final de la hidrólisis ácida (900 seg). Los números en la parte superior de la figura indican el tiempo (seg), de la acción de la digestión alcalina.

6.3.3. Análisis de aminoácidos totales.

Durante el proceso de digestibilidad *in vitro*, se tomaron muestras para la evaluación de aminoácidos libres totales (AALT) de cada uno de los ingredientes estudiados. La comparación de las concentraciones de aminoácidos al inicio de la digestión ácida, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los ingredientes evaluados, donde el ingrediente que presentó la mayor concentración inicial de aminoácidos fue el hidrolizado de pescado comercial, seguido de la harina de calamar, después la harina de langostilla, en cuarta posición la harina de sardina, después la caseína, y finalmente la harina de sangre de res (Tabla 12).

Al terminar la hidrólisis ácida (900 segundos), la concentración de aminoácidos liberados se modificó, por lo que al comparar la concentración de aminoácidos en este punto de la digestión se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), donde el ingrediente que liberó más aminoácidos fue el hidrolizado de pescado, siendo mayor que el resto de los ingredientes. La harina de calamar y de langostilla no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero liberaron mayor concentración de AALT que la caseína, la harina de sardina y la harina de sangre de res. Entre la harina de sardina y la caseína no se detectaron diferencias significativas, pero estas

concentraciones de aminoácidos fueron significativamente mayores en comparación con la concentración liberada por la harina de sangre de res. Cabe mencionar, que desde el inicio de la digestión, tanto la mayor, y la menor concentración de aminoácidos liberados, fueron encontradas en el hidrolizado comercial de pescado, y la harina de sangre de res, respectivamente.

Al iniciar la digestión alcalina la comparación de las concentraciones de AA liberados de los ingredientes prácticamente no varió, aunque la concentración de la harina de sangre de res se equiparó estadísticamente con la concentración de la caseína y de la harina de sardina. A partir de los 100 segundos de iniciada la digestión alcalina y hasta el final de ésta (2,700 segundos), hubo fluctuaciones en la concentración de AALT entre los ingredientes, para calcularse al final de la digestión alcalina, que la concentración de AA liberados significativamente más alta se detectó en el hidrolizado comercial de pescado, seguida de la harina de langostilla y la harina de calamar, no siendo significativamente diferentes entre sí estas últimas. Finalmente, las menores concentraciones de AA liberados fueron detectadas para la caseína, la harina de sardina y la harina de sangre de res, no siendo diferentes estadísticamente entre sí (Fig. 40).

Tabla 12. Comparación de la concentración parcial de aminoácidos liberados a partir de la digestión ácida y alcalina *in vitro* de los ingredientes proteínicos utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (promedio $\pm$ desv. est, n=3)

Tiempo (seg)	Fase ácida			Fase alcalina						
	0-(l)	900-(f)		0	100	250	500	1000	1500	2700
Ingrediente	Concentración de aminoácidos liberados ($\mu\text{g/ml}$)									
Caseína	165.1 $\pm$ 51.0e	320.7 $\pm$ 47.2c		372.6 $\pm$ 28.7c	399.3 $\pm$ 21.3d	410.3 $\pm$ 38.6c	433.9 $\pm$ 20.6cd	507.8 $\pm$ 59.7c	555.0 $\pm$ 58.6c	751.5 $\pm$ 59.0c
Hidrolizado de pescado	954.3 $\pm$ 7.9a	1067.5 $\pm$ 36.0a		1036.0 $\pm$ 31.4a	1193.2 $\pm$ 37.4a	1187.0 $\pm$ 11.9a	1168.1 $\pm$ 35.4a	1227.8 $\pm$ 19.1a	1341.0 $\pm$ 23.7a	1480.9 $\pm$ 40.3a
Harina de sardina	256.3 $\pm$ 11.9d	328.6 $\pm$ 19.1c		322.3 $\pm$ 22.3c	404.0 $\pm$ 26.0d	369.5 $\pm$ 28.4cd	443.3 $\pm$ 20.6c	427.6 $\pm$ 5.4c	520.4 $\pm$ 15.2c	595.8 $\pm$ 26.0c
Harina de langostilla	471.6 $\pm$ 34.0c	674.4 $\pm$ 12.5b		721.6 $\pm$ 14.1b	724.8 $\pm$ 2.7c	743.6 $\pm$ 47.2b	790.8 $\pm$ 30.3b	823.8 $\pm$ 17.9b	823.8 $\pm$ 31.4b	900.8 $\pm$ 33.0b
Harina de calamar	671.3 $\pm$ 32.1b	745.2 $\pm$ 33.0b		726.3 $\pm$ 17.0b	822.2 $\pm$ 28.8b	808.1 $\pm$ 26.0b	825.4 $\pm$ 28.7b	842.7 $\pm$ 35.7b	880.4 $\pm$ 7.2b	899.3 $\pm$ 9.8b
Harina de sangre	80.2 $\pm$ 12.5f	217.0 $\pm$ 28.7d		350.6 $\pm$ 10.9c	336.4 $\pm$ 19.1d	344.3 $\pm$ 4.7d	405.6 $\pm$ 8.2d	421.3 $\pm$ 11.9c	506.2 $\pm$ 19.6c	572.3 $\pm$ 21.3c

Las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

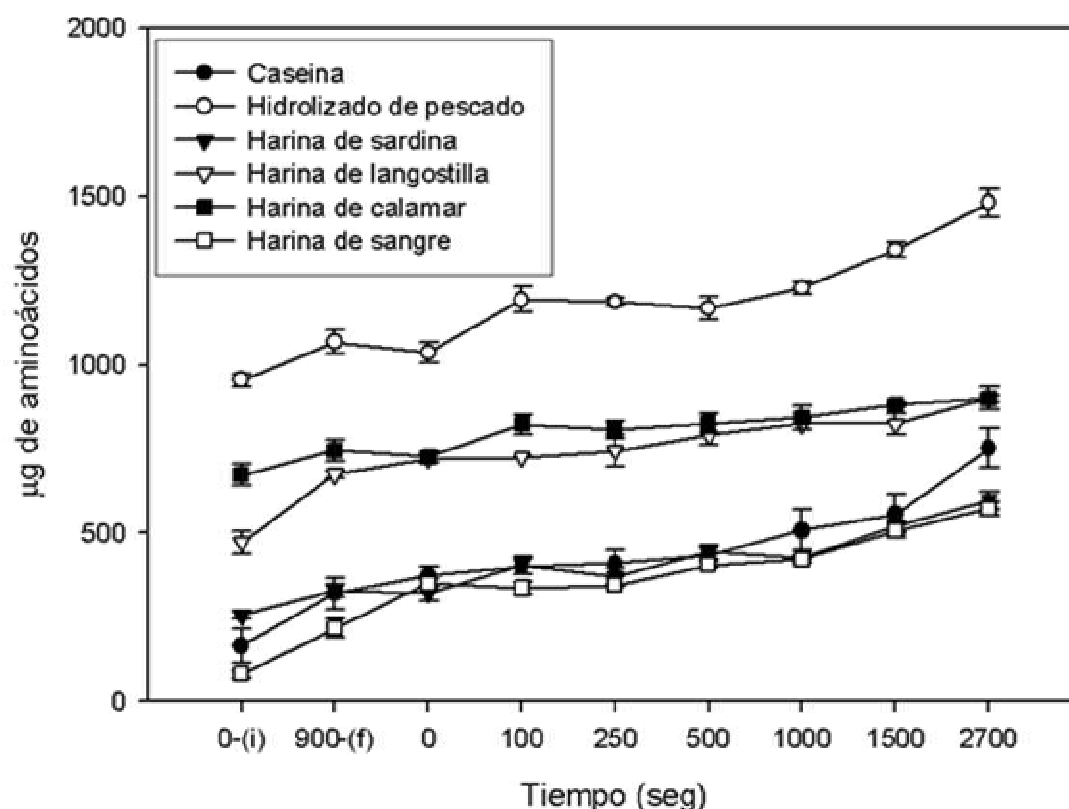


Figura 40. Concentración de aminoácidos liberados durante la digestión ácida y alcalina de los ingredientes proteínicos utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (Promedio $\pm$ desv. est., $n=3$).

Con el fin de determinar una tasa de liberación se ajustaron las concentraciones de AALT de cada ingrediente proteínico a una ecuación lineal en relación al tiempo, siendo significativo el ajuste con altas correlaciones en todos los casos (Figs. 41 a-f). De esta manera al comparar las tasas de consumo a partir de las rectas de regresión se detectó que las mayores tasas de liberación de aminoácidos fueron obtenidas para el hidrolizado comercial de pescado, la caseína y la

harina de sangre de res, no detectándose diferencias significativas entre ellas, aunque si en comparación al resto de los ingredientes. Por otra parte, la tasa de liberación AALT de la harina de sangre de res no mostró diferencia significativa comparada con la tasa de liberación de la harina de pescado y de la harina de langostilla. La harina de calamar fue el ingrediente que mostró la menor tasa de liberación de AA comparada contra el resto de los ingredientes (Tabla 13).

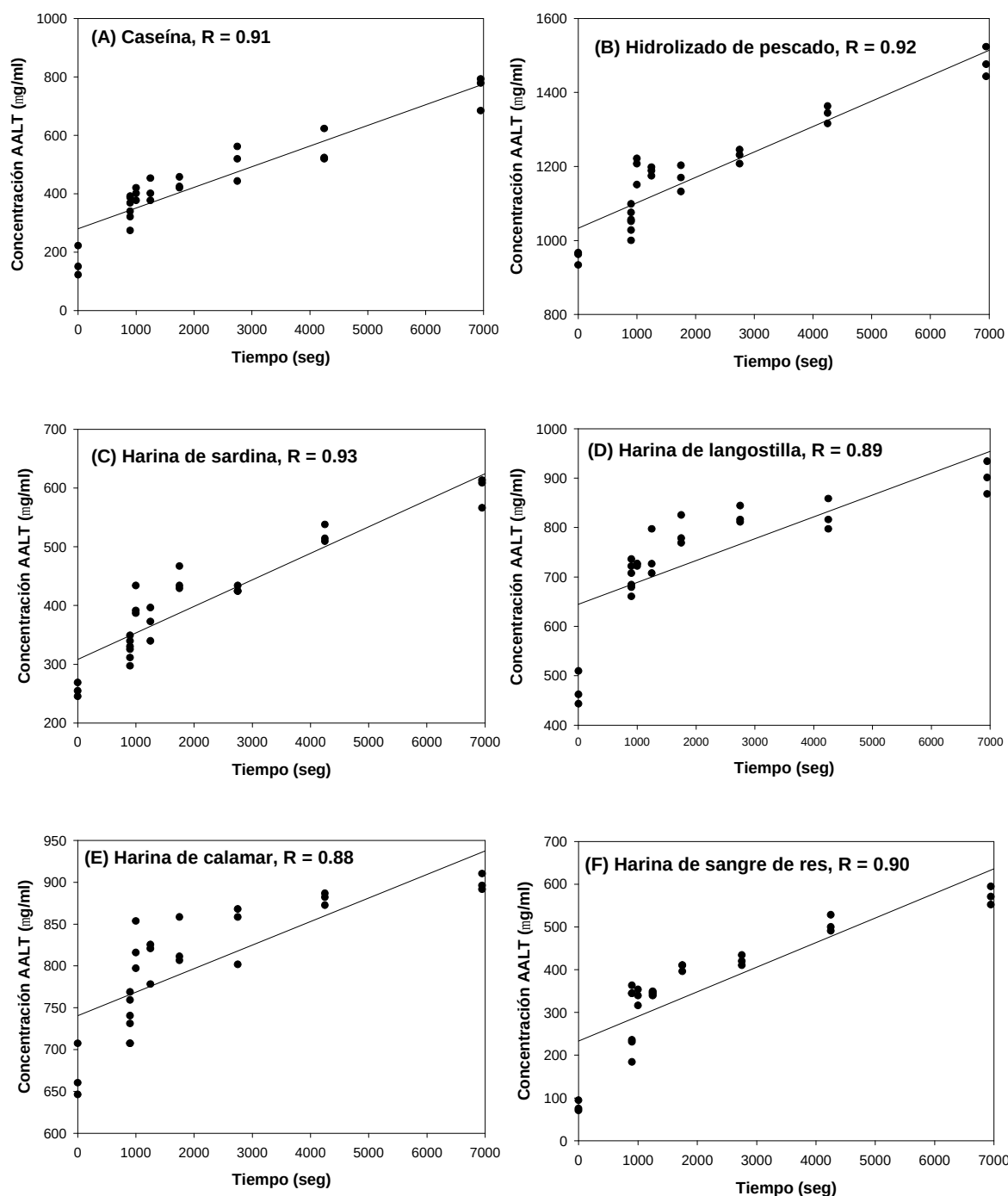


Figura 41. Ajuste al modelo lineal de la liberación de aminoácidos totales durante la digestión ácida y alcalina *in vitro* por ingrediente proteínico, utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera. a) Caseína; b) Hidrolizado comercial de pescado; c) Harina de sardina; d) Harina de langostilla; e) Harina de calamar; f) Harina de sangre de res.

Tabla 13. Tasa de liberación de aminoácidos por ingrediente proteínico a partir de la digestibilidad ácida y alcalina *in vitro*, utilizando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenera (n=3).

Ingrediente	Tasa de liberación ($\mu\text{g/ml} \times \text{seg}$)
Caseína	0.0708 ^a
Hidrolizado de pescado	0.0687 ^a
Harina de sardina	0.0451 ^b
Harina de langostilla	0.0442 ^b
Harina de calamar	0.0281 ^c
Harina de sangre	0.0576 ^{ab}

Los superíndices diferentes en la columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.4. DISCUSIÓN.

Por medio de la simulación de la capacidad digestiva de los organismos en sistemas de digestibilidad "*in vitro*" ha sido posible la evaluación de alimentos en organismos terrestres (Boissen y Eggum, 1991) y su aplicación a organismos marinos (Grabner, 1985; Dimes y Haard, 1994; Bassompierre *et al.*, 1997). Estas técnicas se basan en la incubación de enzimas en una cantidad determinada de sustrato bajo condiciones constantes de temperatura y pH, ya sea manteniendo en el sistema los productos de hidrólisis o drenándolos continuamente (sistemas cerrados o abiertos respectivamente), además que este tipo de técnicas presentan la ventaja de ser de bajo costo, facilidad en su realización y ofrecer resultados rápidos (Rozan *et al.*, 1997). Una de las técnicas más ampliamente usada es la del pH Stat, la cual permite cuantificar la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados y por consiguiente, medir la capacidad digestiva de los organismos (Dimes y Haard, 1994; Alarcón-López *et al.*, 1999b).

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la predicción de la digestibilidad proteínica en alimentos para humanos (Eggum *et al.*, 1989; McDonough *et al.*, 1990; Swaisgood y Catignami, 1991), y su posterior aplicación a otros organismos, por ejemplo, Grabner (1985) y Grabner y Hofer (1985) aplicaron esta técnica en el estudio de la digestibilidad de diferentes proteínas en carpa y trucha, y más recientemente ha sido usada para evaluar la digestibilidad para peces marinos (Dimes y Haard, 1994) y crustáceos (Ezquerro, 1997; Lazo *et al.*, 1998). También ha sido empleada en la optimización de la fracción proteínica de microcápsulas utilizadas en la alimentación de larvas de peces marinos (Alarcon *et al.*, 1999a).

Sin embargo, a pesar de que esta técnica ha sido ampliamente usada, la

correlación con los estudios de digestibilidad *in vivo* con dietas semipurificadas utilizando marcadores indigeribles ó con dietas prácticas, y sus efectos con el crecimiento son limitados. Esto se debe a que la digestibilidad *in vitro* presenta limitaciones, las cuales pueden ser divididas en dos grupos: a) Antes de la aplicación de la técnica como son: la condición fisiológica del organismo, la forma en la que se extraen las proteínas solubles, el tipo de almacenamiento de los extractos multienzimáticos, entre muchos otros, y b) durante la aplicación de la técnica, donde resaltan: la temperatura y el pH durante el corrimiento del ensayo (que no necesariamente es la temperatura fisiológica), el tiempo de duración del ensayo, la concentración del sustrato, y que este tipo de ensayos solamente funcionan por un tiempo corto al haber procesos de autoinhibición por saturación de producto (en el caso de los ensayos *in vitro* de tipo cerrado).

Se debe considerar que en la realidad, los seres vivos presentan una capacidad de digestión y asimilación mucho más compleja que cualquier tipo de dispositivo diseñado por el hombre. De esta manera durante el tránsito del alimento a lo largo del tracto digestivo, no solamente funcionan las enzimas digestivas, sino que existen esfínteres que mantienen el alimento en contacto con las enzimas, el epitelio gástrico e intestinal presentan pliegues especializados para asimilar los nutrientes, se da la acción de hormonas digestivas que provocan movimientos peristálticos, entre muchos otros aspectos que no han sido contemplados, y que provocan diferencias al intentar correlacionar la digestibilidad de estos estudios con experimentos *in vivo* (Dimes y Haard, 1994).

En el presente estudio, se observó que las proteínas de origen animal que se evaluaron tuvieron grados de hidrólisis variables, tanto en la fase ácida como la alcalina. El grado de

hidrólisis (GH) más alto se obtuvo con la caseína (13.34 %), la cual se usa como valor de referencia; este producto, a pesar de tener un GH alto, no es utilizado en la fabricación de dietas debido a que presenta carencia de aminoácidos, además de ser un ingrediente semipurificado a partir de la leche bovina lo que encarece fuertemente su valor.

El segundo valor más alto de GH fue obtenido para la harina de sangre de res (10.39 %), la cual es un producto de origen español, obtenido a partir de la liofilización de la sangre de res (este ingrediente es considerado como no convencional), pero que es fácil de obtener. Con la harina de langostilla se obtuvo el tercer más alto valor de GH (9.84 %); este ingrediente fue fabricado a nivel industrial en la Conservadora de San Carlos bajo la supervisión de los investigadores del CIBNOR a través de un proceso de calor indirecto, con lo cual se cuidó la calidad del producto, controlando la temperatura para evitar quemar la harina. Una característica especial de productos obtenidos a partir de crustáceos, es el alto contenido de cenizas que se obtiene al procesarse con todo y exoesqueleto, lo cual provoca que la cantidad de proteína cruda sea menor.

Para la harina de calamar se obtuvo el cuarto valor de GH más alto (7.98 %); se debe resaltar que esta harina fue procesada en la Conservera de Santa Rosalía, bajo el mismo procedimiento (calor indirecto), aunque en este caso, el producto no fue monitoreado durante su proceso de fabricación. Para el hidrolizado proteínico de pescado comercial, que es un producto noruego, se obtuvo un valor bajo de GH (7.19 %), aunque se debe considerar que este ingrediente fue elaborado por un proceso de hidrólisis enzimática, lo que pudo haber provocado una menor hidrólisis al probarse con el extracto multienzimático de los juveniles de cabrilla arenera. Finalmente, con la harina de sardina se obtuvo el valor de

GH más bajo de todos (6.47 %), lo cual puede considerarse como crítico, si se toma en cuenta que este ingrediente es la base para la formulación y fabricación de dietas inertes; este ingrediente fue también fabricado en la Conservera de San Carlos, pero no fue monitoreado durante su proceso de fabricación, lo que puede explicar el bajo GH obtenido. Una posibilidad es que este ingrediente haya sufrido un exceso de calor durante su secado, lo cual desnaturaliza la proteína y aumenta el contenido de cenizas, disminuyendo así su calidad.

Valores mayores han sido obtenidos para la harina de pescado por Moyano-López *et al.* (1998) utilizando los extractos multienzimáticos de juveniles de la dorada (13.34 %) y el dentón (14.98 %), aunque estos organismos eran peces más grandes que los utilizados, además el tipo de materia prima y tecnología de procesamiento de las harinas de pescado fueron distintos a la harina empleada en este estudio. Dimes y Haard (1994), han cuantificado el GH de la caseína en 17.5 % y para una harina de arenque en 12.42 %, utilizando extractos multienzimáticos de salmónidos. Estos valores son mayores a los registrados para los juveniles de la cabrilla arenera. Asimismo, en el estudio de Dimes *et al.* (1994a y b) con proteasas alcalinas de salmónes, se obtuvieron valores más altos de GH para todos los ingredientes, comparados con los evaluados aquí para la cabrilla arenera. Los valores que obtuvieron fueron: para la caseína 25.5 %, para una serie de harinas de pescado Premium un intervalo entre 19 y 21 %, mientras que para una harina de pescado común se calculó un valor de GH de 14.4 %. Estos autores mencionan que esta variación en los valores depende de una serie de factores como la calidad de la harina que se esté evaluando, las condiciones del ensayo, la edad del pez, y su capacidad enzimática, entre muchas otras. Por otra parte, el valor de GH para el hidrolizado de proteína de pescado fue similar al

obtenido con el salmón del Atlántico *Salmo salar* (10-14 %) al evaluar este ingrediente con varios tipos de proteasas alcalinas (Kristinsson *et al.*, 2000b y c). Esto autores mencionan además que, dependiendo del tipo y calidad del hidrolizado, su utilización mejorará los procesos de absorción en el intestino de los organismos. Es importante resaltar que en este experimento se omitió el uso de ingredientes de origen vegetal para someterlos al ensayo, ya que éstos no serían usados para la formulación y fabricación de dietas para larvas.

De todos los ingredientes utilizados aquí, resulta evidente que la harina de sardina fue la que menor GH mostró, lo cual es bastante serio ya que como es bien sabido, la gran mayoría de las dietas completas utilizadas para el cultivo de organismos marinos se basa en la inclusión de una alta cantidad de harina de pescado para alcanzar los altos porcentajes de proteína que se requieren en la dieta. Es preocupante que esta harina sea tan difícil de hidrolizar por los juveniles de la cabrilla arenera mismo que puede deberse a dos aspectos: 1) que durante el proceso de fabricación de esta harina, no estén optimizados totalmente los procesos de cocimiento, molienda y secado, y que su calidad sea baja, ya sea por el alto contenido de cenizas que ocasionan una baja en su digestibilidad o porque haya sido “quemada” durante el proceso de secado, y 2) que durante el proceso de fabricación de la harina, los pescados no fueran procesados rápidamente, y por consecuencia se hayan generado sustancias tóxicas o antinutricionales (como aminos biogénicos) que estuviesen presentes en la harina ya terminada (Smith *et al.*, 2000), y que por esta razón inhibieran la acción de las proteasas durante el ensayo *in vitro*.

Como es bien sabido, durante las pasadas dos décadas la producción de alimentos acuícolas, y en particular para la alimentación de peces carnívoros y camarones, ha sido dependiente del uso

de harina y aceite de pescado como las fuentes principales de proteína y lípidos dietarios. Estos dos ingredientes, junto con algunos otros en menor cantidad, representan del 50 al 85 % del total de la dieta de camarones y peces carnívoros (Tacon y Barg, 1998). Por ejemplo, se ha estimado que en 1998 el consumo de harina y aceite de pescado en dietas para acuicultura fue de 2'256,232 TM (toneladas métricas) y 648,748 TM respectivamente, lo que representó el 42.5 y 77 % del total de la producción de harina y aceite de pescado (Tacon y Foster, 2000). Es así que para el 2010 se ha proyectado un incremento en la utilización de harina y aceite de pescado de 54 y 97 % respectivamente (Zaldivar-Larain, 2002).

Las proyecciones más optimistas en relación a la disponibilidad y uso de los productos pesqueros en alimentos para animales (incluyendo los acuícolas) hechos a partir de harina y aceite de pescado no son muy prometedoras, ya que 1) se desconoce el posible costo de producción en la siguiente década, de la harina y aceite de pescado, al aumentar de 4.5 a 6.5 millones de TM y de 0.75 a 1.25 millones de TM, respectivamente. 2) la demanda creciente de harina y aceite de pescado para la alimentación durante la engorda de diversos organismos contra las necesidades de alimentación humana, 3) el riesgo potencial de la posible transmisión de enfermedades a peces y crustáceos por el uso de alimentos compuestos de harinas inadecuadamente procesadas o contaminadas, 4) La incertidumbre de los mercados para el consumo de peces carnívoros y crustáceos, y 5) el aumento en la preocupación pública por mejorar la eficiencia de los recursos usados en agricultura y pesquerías, incluyendo el desarrollo de una tecnología acuícola segura, que permita la reducción de la dependencia hacia el uso de harinas y aceites de pescado, por medio de la inclusión de ingredientes alternativos de alta digestibilidad como harinas Premium

que actualmente se producen en Noruega y Chile (Tacon y Foster, 2000; Zaldivar-Larrain, 2002). Sin embargo, esta sustitución deberá hacerse de manera adecuada, tomando en cuenta ciertas consideraciones: a) la sustitución debe ser evitada en zonas vulnerables a la contaminación de nitrógeno, por ejemplo donde el movimiento de agua sea pobre, como es el caso de depósitos cerrados y fiordos, b) la sustitución puede hacerse a escala piloto para poder entender y minimizar los posibles efectos adversos, y c) una vez conocidos todos los aspectos a escala piloto se recomienda probar la posibilidad de la sustitución a escala comercial, en especial durante la engorda en jaulas flotantes para evitar la contaminación ambiental por pérdida excesiva de nitrógeno y fósforo (Hardy, 2000; Zaldivar-Larrain, 2002).

Desde cualquier perspectiva, si la harina de pescado utilizada en este estudio, presenta alguno o todos estos inconvenientes, su utilización en dietas para la alimentación de peces marinos se deberá revalorar, en especial si se pretende utilizar como único o principal ingrediente en la fabricación de dietas para larvas. De esta manera, intentar sustituir de forma parcial o total la harina de pescado (sardina) por ingredientes más adecuados y de mayor calidad durante su fabricación, permitirán elaborar dietas de alta digestibilidad para el larvicultivo de peces marinos. En la medida de que los procesos de fabricación de harinas se mejoren, dando un manejo más adecuado de los productos pesqueros que lleguen a la planta de procesamiento, eliminando componentes antinutricionales por medio de procesos industriales, y optimizando todos los pasos de fabricación, se podrán fabricar dietas de alta digestibilidad y fáciles de asimilar que mejorarán el crecimiento de los organismos.

En el caso de la harina de sangre de res, se obtuvo un alto GH (10.39 %),

siendo muy cercano a lo obtenido para la caseína. Presenta una cantidad de proteína cruda muy alta (81 %), por lo que su utilización en dietas para larvas de peces marinos podría ser adecuado. Esta harina se ha utilizado como sustituto parcial de la harina de pescado en dietas para tilapias a inclusiones del 17 % en la dieta y se han obtenido buenos resultados (El-Sayed, 1998); sin embargo, este ingrediente no ha sido utilizado en la formulación y fabricación de dietas para larvas, mismo que debe hacerse con cuidado, ya que el alto contenido de hierro puede tener ciertos efectos antinutricionales. Además, dependiendo de la calidad en el proceso de la fabricación, se pueden presentar aminos biogénicos que pueden tener efectos adversos sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Smith *et al.*, 2000).

La langostilla *Pleuroncodes planipes* es un crustáceo muy abundante en México, pero no ha sido aprovechado. Civera-Cerecedo *et al.* (1999 y 2000) lo están estudiando para lograr su explotación y aprovechamiento en dietas para organismos marinos, ya sea utilizándola como harina, hidrolizado proteínico, concentrado proteínico, o como aceite. Diversos trabajos experimentales como los de Goytortúa-Bores (1993), Fernández-Millán (1996), Hernández-González (1999), Goytortúa-Bores (2000), Galicia-González (2001), Sosa-Gómez (2002) y Gutiérrez-Leyva (2003) han estudiado diferentes productos obtenidos de la langostilla para la alimentación de crustáceos. El único trabajo donde se ha intentado el uso de alguno de los productos obtenidos a partir de la langostilla en peces marinos es el de Roldán-Libenson *et al.* (1999), quienes evaluaron el uso de aceite de langostilla para el enriquecimiento de rotíferos empleados en la alimentación de larvas de cabrilla arenosa, obteniendo buenos resultados en cuanto al crecimiento de estos organismos.

En el presente trabajo, la harina de langostilla tuvo un buen grado de hidrólisis (9.84 %), sin embargo presenta un inconveniente, ya que el nivel de proteína que alcanza como harina es solamente de 38 % y contiene una alta concentración de quitina y cenizas. Si se considera esta harina como sustituto total de la harina de pescado, los niveles de proteína en las fórmulas disminuirían, por lo que el uso de hidrolizados con mayor nivel de proteína serían más recomendables en dietas para peces marinos, en especial en períodos larvarios donde se prefiere mantener niveles de proteína superiores a 50 % (Kolkovski, 2001). Asimismo, este ingrediente podría considerarse no como un sustituto, sino como un aditivo nutricional con alta capacidad attractante. Por otra parte, se desconoce la capacidad quitinolítica de las larvas de la cabrilla arenosa, y por ende, se necesita profundizar aún más en este tipo de temáticas, a fin de lograr su utilización en fórmulas para microdietas o usar algún otro de los productos obtenidos a partir de la langostilla que contengan menores niveles de quitina y mayores niveles de proteína dietaria como los son los hidrolizados enzimáticos.

El calamar es un recurso de disponibilidad estacional en México, por lo que la utilización de este tipo de harinas es poco frecuente, pero ampliamente usado en Europa y Asia, donde existe toda una infraestructura y es comercialmente factible. Además, esta harina es de muy alta calidad, conteniendo una buena proporción de proteína que es fácilmente digerida y que contiene proporciones de aminoácidos adecuadas para la alimentación de organismos marinos. Dado que se obtuvo GH de 7.98 % se considera como un ingrediente adecuado para la formulación de dietas para larvas de peces marinos como ha sido resaltado por Kolkovski y Tandler (2000) los cuales utilizaron un hidrolizado de calamar para sustituir la harina de pescado,

obteniendo buenos resultados en la alimentación de larvas de *Hippoglossus hippoglossus*.

Por otra parte, cada año, más de 91 millones de toneladas métricas de pescado (MTM) son capturadas, de las cuales 29.5% es transformado en harina y del resto de la producción, posiblemente más del 50 % del peso pertenece a los tejidos remanentes de los peces y son considerados como desechos que no son utilizados (Mackie, 1982). Si consideramos esta información y además es bien conocido que año con año la población mundial se incrementa y las capturas pesqueras no excederán un estimado de 100 MTM/año, se requerirá la necesidad de utilizar los recursos marinos con más inteligencia y previsión. Una forma de utilizar estos desechos obtenidos del procesamiento de los pescados, es por medio de la aplicación de tecnología enzimática que permita recobrar la proteína durante el procesamiento de los productos, ya sea como hidrolizados o concentrados proteínicos que pongan a disponibilidad nuevos ingredientes y subproductos alimenticios, los cuales tendrán una amplia variedad de aplicaciones (Pigott, 1982; Kristinsson y Rasco, 2000a). Aunado a lo anterior, las proteínas derivadas de animales marinos son consideradas superiores a las de organismos terrestres y de las plantas, ya que contienen un mejor balance de los aminoácidos esenciales que cubrirán más adecuadamente los requerimientos nutricionales de los peces y crustáceos.

Los hidrolizados proteínicos de pescado han sido fabricados, ya sea a partir de músculo, pescado entero o carcaje, y son ampliamente recomendados para su utilización en dietas para organismos marinos, aunque solamente en ciertas proporciones (Kolkovski y Tandler, 2000). Sin embargo, la fabricación de este tipo de ingredientes puede ser costosa e incrementar el precio de las dietas significativamente. Se debe considerar

que dependiendo del proceso de fabricación de los hidrolizados, la cantidad de péptidos y aminoácidos libres variará de manera importante, por lo que su disposición y absorción dentro del sistema digestivo de los organismos puede llegar a provocar ciertos problemas; como por ejemplo, la carencia de ciertos aminoácidos esenciales que no serán absorbidos si se excede la concentración óptima de aminoácidos libres totales al ser saturados todos los sitios de absorción y por lo tanto, se pierdan rápidamente durante su tránsito dentro del tubo digestivo (Kristinsson y Rasco, 2000a). Al probarse este ingrediente con los extractos multienzimáticos de los juveniles de la cabrilla arenosa, se obtuvo un mediano grado de hidrólisis (7.19 %), probablemente debido a que ya de forma inicial este ingrediente presenta un alto grado de hidrólisis, y que fue observado durante la medición de los AALT. De esta manera, si consideramos esta información y su alto porcentaje de proteína cruda (73 %), este ingrediente es un buen candidato para ser utilizado en dietas para larvas, sin embargo, se deberá poner atención en el porcentaje de inclusión más adecuado ya que este se desconoce para la cabrilla arenosa. En juveniles de trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* se han recomendado sustituciones por harina de pescado hasta de 54 %, obteniéndose buenos resultados tanto en crecimiento como en supervivencia, pero sustituciones mayores no tuvieron efectos benéficos adicionales (Rodehutscord *et al.*, 1995).

A partir de estos resultados, consideramos que la facilidad que mostraron los juveniles de la cabrilla arenosa para hidrolizar algunas de las proteínas de origen animal de los ingredientes probados, permitirá incluirlos para la fabricación de dietas para larvas, con la seguridad de que serán fácilmente digeridos y absorbidos, una vez que las dietas que los contengan

sean consumidas por los peces. Como mencionan Moyano y Savoie (2001), la correcta selección de ingredientes que sean fácilmente digeridos es la clave para lograr el éxito en la acuicultura a gran escala, ya que reducirá los costos de la fabricación de los alimentos y evitará pérdidas del alimento, ya sea por no ser consumido o no poder ser digerido por los peces. Asimismo, el trabajo de Srivastava *et al.* (2002) demostró que la digestibilidad de proteínas usando técnicas electroforéticas en larvas del lenguado Japonés depende del tipo de proteína utilizada, por lo que se deberá realizar una selección adecuada de ingredientes para poder elaborar dietas correctamente balanceadas, si se quiere llegar a sustituir el alimento vivo por dietas inertes durante el larvicultivo.

Desde hace algunos años, existe el interés de sustituir la utilización de las presas vivas en el larvicultivo de peces marinos por dietas inertes (Kolkovski *et al.*, 1997a; Salhi *et al.*, 1997; Chu y Ozkizilcik, 1999; Yúfera *et al.*, 1999; Kolkovski y Tandler, 2000; Koven *et al.*, 2001b). Sin embargo, la biodisponibilidad de nutrientes está muy limitada por la baja o nula capacidad enzimática de muchas de las larvas para digerir moléculas proteínicas complejas (Lauff y Hofer, 1984), aunque, existen especies como la lubina y la dorada que han demostrado poseer una maquinaria enzimática completa desde fases tempranas de vida, por lo que se han logrado desarrollar dietas inertes para su larvicultivo (Cahu y Zambinono-Infante, 1995; Moyano *et al.*, 1996). Conjuntando los estudios de ontogenia enzimática con técnicas para la selección de ingredientes, es posible desarrollar dietas adecuadas de alta digestibilidad para la alimentación de las larvas (Alarcón *et al.*, 2001).

Tomando en cuenta los valores de grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de los ingredientes estudiados aquí, se recomienda la utilización de harina de

sangre de res, el hidrolizado proteínico de pescado y la harina de calamar para determinar su valor nutritivo *in vivo* como

sustitutos parciales de la harina de pescado en dietas inertes para el destete de larvas de la cabrilla arenosa.

6.5. CONCLUSIONES.

La capacidad de los juveniles de la cabrilla arenera (45 DDE) para digerir ingredientes de origen animal es buena, siendo esta similar a la reportada para otras especies marinas excepto para la harina de pescado (sardina) que tuvo el menor grado. Es probable que la baja digestibilidad de este ingrediente se deba a un mal proceso de fabricación de fabricación de la harina (sobrecalentamiento), que haya ocasionado que las enzimas digestivas de los juveniles no la pudieran hidrolizar tan fácilmente como a los otros ingredientes.

La harina de sangre de res y el hidrolizado proteínico de pescado comercial tuvieron los GH's más altos calculados para la cabrilla arenera; en el caso específico del hidrolizado, presentó un GH parecido a los calculados para otras especies de peces y las concentraciones de AALT más elevados de todos los ingredientes probados.

La harina de calamar mostró menores niveles de GH que los calculados para el resto de los ingredientes. Sin embargo, tiene la peculiaridad de poseer el segundo mayor nivel de AALT, el cual lo hace un ingrediente interesante para ser evaluado en dietas para esta especie.

La harina de langostilla es un ingrediente de alta digestibilidad y con una buena concentración de AALT, aunque contiene bajos niveles de proteína y cantidades elevadas de quitina y cenizas. El bajo valor de proteína de este ingrediente ocasionaría una caída en los niveles de proteína total de la dieta que lo contenga. Por otra parte, se desconoce el efecto que ocasionaría su alto contenido de quitina; es por esto que se requeriría estudiar la capacidad quitinasa de la cabrilla arenera, y la posibilidad de usar hidrolizados o concentrados de proteína de langostilla en la elaboración de dietas para juveniles de la cabrilla arenera.

Finalmente, de todos los ingredientes evaluados, se concluye que el uso de la harina de sangre de res, el hidrolizado proteínico de pescado y la harina de calamar pueden ser componentes adecuados para la elaboración de dietas para larvas, sustituyendo parcialmente la utilización de la harina de pescado.

7. UTILIZACIÓN DE DIETAS MICROPARTICULADAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y DESTETE TEMPRANO DE LARVAS DE LA CABRILLA ARENERA.

7.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar el valor nutricional de dietas microparticuladas que contienen diferentes fuentes de proteína para el destete, a dos tiempos distintos, de larvas de la cabrilla arenera.

Comparar la supervivencia y composición química de los juveniles de la cabrilla arenera destetados con las dietas microparticuladas y sometidos a una prueba de resistencia al manejo.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.2.1. Crianza larvaria y protocolo de destete

Los huevos de la cabrilla arenera fueron obtenidos por medio de un desove natural de reproductores mantenidos en el Sistema de Inducción al Desove del Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN, bajo el método propuesto por Rosales-Velázquez (1997). Posteriormente, fueron trasladados a la UPIMA, donde fueron incubados en tres tolvas cilíndricas de fibra de vidrio y de 100 l de capacidad a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, salinidad de $36.0 \pm 0.5 \text{‰}$, y con aireación moderada hasta la eclosión (aproximadamente 24 h).

El esquema de crianza aplicado fue el propuesto por Alvarez-González *et al.* (2001a) modificado para eliminarlos adultos de *Artemia*. Para la siembra, se realizó un conteo de los eleuteroembriones que eclosionaron y se homogenizó lenta y manualmente la columna de agua de las tolvas incubadoras para asegurar una densidad de siembra de 20 larvas/l que fueron

sembradas en el Sistema de Circulación Cerrada (SCC-18). Durante los primeros 8 días de cultivo, las larvas fueron mantenidas en agua verde adicionando de 300,000 a 600,000 cel/ml de la microalga *Nannochloropsis oculata*, debido a una baja recirculación de agua durante este tiempo ($<2 \text{ %}$ diario). Las larvas fueron alimentadas a partir del día 2, cuando han absorbido el saco vitelino y pigmentado los ojos, con el rotífero *Brachionus plicatilis*, suministrándose inicialmente sin enriquecer por los dos primeros días y enriqueciéndolos diariamente con la emulsión comercial SELCO® (INVE Aquaculture; Derdenmonde, Bélgica) hasta el día 15. A partir de este día, se alimentó a las larvas con nauplios de *Artemia sp.* (INVE, Aquaculture; Derdenmonde, Bélgica) sin enriquecer hasta el día 17, a partir del cual se suministraron nauplios de *Artemia* enriquecidos con la misma emulsión utilizada para los rotíferos, en las concentraciones recomendadas por el fabricante. Las densidades utilizadas para cada alimento vivo y las cantidades suministradas de dieta microparticulada (DMP) se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Esquema de alimentación durante la crianza de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. s = sin enriquecer; e = enriquecido; n = nauplio; j = juvenil

Día	Microalga <i>Nannochloropsis</i> sp. (cel/ml)	Rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> (org/ml)	Artemia sp. (org/ml)		DMP (g)	
			D17	D22	D17	D22
1	3 x 10 ⁵	-	-	-	-	-
2	3 x 10 ⁵	1 s	-	-	-	-
3	3 x 10 ⁵	2 s	-	-	-	-
4	6 x 10 ⁵	4 e	-	-	-	-
5	6 x 10 ⁵	6 e	-	-	-	-
6	6 x 10 ⁵	10 e	-	-	-	-
7	6 x 10 ⁵	12 e	-	-	-	-
8	6 x 10 ⁵	16 e	-	-	-	-
9	-	20 e	-	-	-	-
10	-	20 e	-	-	-	-
11	-	16 e	-	-	-	-
12	-	12 e	-	-	-	-
13	-	8 e	-	-	-	-
14	-	4 e	-	-	-	-
15	-	2 e	0.5 n s	0.5 n s	-	-
16	-	-	1 n s	1 n s	-	-
17	-	-	1 s; 1 n e	1 s; 1 n e	0.1	-
18	-	-	2 s; 2 n e	2 s; 2 n e	0.1	-
19	-	-	6 n e	6 n e	0.1	-
20	-	-	8 n e	8 n e	0.2	-
21	-	-	-	10 n e	0.2	-
22	-	-	-	8 j e	0.2	0.1
23	-	-	-	6 j e	0.25	0.1
24	-	-	-	4 j e	0.25	0.2
25	-	-	-	2 j e	0.25	0.2
26	-	-	-	-	0.3	0.25
27	-	-	-	-	0.3	0.25
28	-	-	-	-	0.3	0.3
29	-	-	-	-	0.3	0.3
30	-	-	-	-	0.3	0.3
31	-	-	-	-	a saciedad	1.5
32	-	-	-	-	a saciedad	2.0
33	-	-	-	-	a saciedad	2.5
34	-	-	-	-	a saciedad	3.0
35	-	-	-	-	a saciedad	3.0
36	-	-	-	-	a saciedad	2.3
37	-	-	-	-	a saciedad	3.1
38	-	-	-	-	a saciedad	3.5
39	-	-	-	-	a saciedad	3.5
40	-	-	-	-	a saciedad	3.5

7.2.2. Diseño experimental y fabricación de las dietas microparticuladas.

Se diseñó un bioensayo de crecimiento donde se evaluaron 5 tratamientos alimenticios por triplicado, consistentes en tres dietas microparticuladas (DMP) y dos tiempos de destete. El primer destete se realizó en el día 17 después de la eclosión (DDE) y el segundo en el día 22 DDE. En ambos destetes hubo una coalimentación, es decir, un suministro

de alimento vivo y DMP al mismo tiempo durante tres días, con proporciones de 70:30, 50:50, y 30:70 (alimento vivo:DMP), al cuarto día de iniciado el destete, la alimentación fue de 100 % con las dietas microparticuladas, mismas que se suministraron cada 3 horas, a partir de las 8:00 AM. A cada tratamiento experimental se asignaron aleatoriamente tres tanques dentro del SCC-18.

Las dietas se diseñaron con la ayuda del paquete de formulación de

alimentos balanceados MIXIT-WIN, cuidando que mantuvieran valores mayores a 50% de proteína, 15% de lípidos y 4800 cal/g de energía. Los ingredientes utilizados fueron: harina de calamar (DC), harina de sangre de res (DS) e hidrolizado de proteína de pescado (DH), y se incluyeron al 15% (en base húmeda) en las dietas, sustituyendo a la harina de sardina, que es la principal fuente de proteína. Estos ingredientes fueron elegidos por la alta cantidad de aminoácidos libres que presentan y por el alto grado de hidrólisis cuantificado en los juveniles, de acuerdo a lo reportado en la sección 6 de esta tesis. Se realizaron análisis químicos a todos los ingredientes para conocer su composición química en el Laboratorio de Análisis Químicos Proximales del CIBNOR, siguiendo las metodologías descritas en el A.O.A.C (1995). La composición química de los principales ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas microparticuladas se muestra en la sección 6.3.1. La formulación y composición química de las tres DMP se presenta en la Tabla 15.

Todos los ingredientes secos a emplear en las dietas fueron tamizados a un tamaño menor de 150 μm , con ayuda

de tamices de granulometría. Los macroingredientes fueron dosificados de acuerdo a la formulación y mezclados, primeramente a mano, y después en una mezcladora vertical Kitchen-Aid, durante 10 minutos. Los microingredientes secos (ligante, premezclas de minerales, vitaminas, etc.) también fueron mezclados a mano, para después incorporarlos poco a poco la mezcla de macroingredientes, dejándolos en la mezcladora por 10 minutos. Paralelamente, se preparó una emulsión con la lecitina de soya y el aceite de pescado, misma que fue incorporada a los ingredientes secos. Posteriormente, se adicionó agua a razón de 35-40% del peso de la masa, y ésta fue extruída en un molino de carne marca Tor-rey con un dado de 5 mm de diámetro. Los pellets fueron cortados manualmente y secados en un horno marca VWR modelo 1600 HAFO series, a 40°C durante 12 horas. Pasado este tiempo, fueron molidos y tamizados para mantener homogéneo el tamaño de la partícula. Las partículas de las DMP fueron separadas en tres principales grupos: 300-500 μm , 500-800 μm y 800-1000 μm , los cuales fueron suministrados de acuerdo al tamaño de boca de las larvas.

Tabla 15. Formulación y composición química de EPA/DHA de las dietas microparticuladas para el destete de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado.

INGREDIENTES	DC %	DS %	DH %
Harina de sardina (HS010-1) ^a	42.72	36.02	41.09
Harina de calamar (HC0101-1) ^a	15.00	0.00	0.00
Harina de sangre (HSAN0201-1) ^b	0.00	15.00	0.00
Hidrolizado de pescado (CPSP2000) ^c	0.00	0.00	15.00
Harina integral de trigo (HT10107-1) ^d	13.13	19.07	17.11
Gluten de trigo (GT0107) ^d	14.00	14.00	14.00
Aceite de sardina (AS0107-1) ^a	6.74	7.00	4.39
Lecitina de soya (LS0107-1) ^e	4.00	4.00	4.00
Alginato (0204-1) ^f	2.00	2.00	2.00
Betaína monohidratada (SIGMA)	1.00	1.00	1.00
Premezcla vitaminas CIBNOR ^g	0.70	0.70	0.70
Premezcla minerales CIBNOR ^h	0.50	0.50	0.50
Cloruro de Colina 65% (SIGMA)	0.13	0.13	0.13
Vitamina C 35% ⁱ , agente activo	0.08	0.08	0.08
BHT(SIGMA)	0.002	0.002	0.002
Análisis químico (g/100 g de materia seca, excepto humedad)			
Proteína	52.2 ± 0.1	55.1 ± 0.1	57.5 ± 0.3
Energía (cal/g)	4886.0 ± 3.9	5395.2 ± 10.3	5103.7 ± 4.9
Cenizas	10.2 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.2 ± 0.1
Fibra	-	-	-
ELN ^j	22.1	21.1	20.0
Humedad	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Ácido graso (µg/mg dieta base seca)			
Extracto etéreo	15.5 ± 0.1	16.0 ± 0.1	15.3 ± 0.1
EPA (20:5 n3)	11.6	14.7	16.0
DHA(22:6 n3)	9.6	12.6	13.3
EPA/DHA	1.2	1.2	1.2

^aPIASA, La Paz, Baja California Sur, México; ^bEspaña; ^cFrancia; ^dGluten y almidones industriales SA de CV, D.F, México.

^eODANAJI. Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C.V. México; ^fALGIMAR, CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México (110 gopoles). n.d. no determinado.

^gPremezcla de vitaminas (mg/Kg de dieta): Vit. A (retinol), 0.6 (ICN); Vit. D3 (colecalférol), 0.0042 (SIGMA); Vit. E (tocoferol), 35 (SIGMA); Vit. K (menadiona), 7 (SIGMA); Vit. B1 (tiamina), 0.7 (SIGMA); Vit. B2 (riboflavina), 2.8 (SIGMA); Vit. B6 (piridoxina), 2.1 (SIGMA); Ácido pentanoico, 14 (SIGMA); Niacina (ácido nicotínico), 7 (SIGMA); Biotina, 0.112 (ICN); Inositol, 210 (SIGMA); Vit. B12 (cianocobalamina), 0.014 (SIGMA); Ácido fólico, 0.7 (SIGMA); Vehículo harina de sorgo.

^hPremezcla de minerales (g/kg de dieta; SIGMA): CaCl₂*5H₂O, 2.57; Na₂HPO₄, 5.72; MgSO₄*7H₂O, 1.49; FeSO₄*7H₂O, 0.18; ZnSO₄*7H₂O, 0.028; MnCl₂*4H₂O, 0.0096; ; CuSO₄*5H₂O, 0.0025; KI, 0.0003 mg; SeS₂, 0.42 mg. ⁱSTAY-ROCHE.

^jELN = 100%- (Proteína cruda + extracto etéreo + fibra + cenizas).

7.2.3. Calidad del agua.

Durante el experimento se midieron diariamente los parámetros de temperatura, salinidad y oxígeno por medio de un oxímetro marca YSI modelo 58 con precisión de 0.1° C, 0.1‰ y 0.01 mgO₂/l, respectivamente, así como las concentraciones de amonio y nitritos (mg/l) por medio de un espectrofotómetro marca Spectronic modelo Genesys 2, mediante métodos colorimétricos

propuestos por Strickland y Parson (1972).

7.2.4. Toma y análisis de muestras.

Los días 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 fueron tomados diez organismos de cada uno de los tanques del SCC-18 para medir su longitud notocordal antes de la aparición de la placa hipúrica y su longitud patrón después de la misma. Previo a las mediciones de longitud, las larvas fueron sometidas al anestésico

MS-222 (metil sulfato de tricaína en solución de 0.15 mg/l) para facilitar su procesamiento y después fueron fijadas con formol al 10 % neutralizado con boratos. Las mediciones de longitud se realizaron con ayuda del paquete analizador de imágenes ImagePro Plus 5, así como con un microscopio estereoscópico marca Olympus y una cámara análoga marca Sony. Posteriormente, las larvas fueron pesadas con ayuda de una balanza

analítica marca Sartorius con una precisión de 1×10^{-4} g, y de un papel filtro con el cual se eliminó el exceso de líquidos. El procedimiento en pesar un papel filtro junto con el juvenil, para después repesarlo y descontarlo para determinar el peso individual del pez.

Se contabilizó el número de peces muertos diariamente, a partir de que las larvas empezaron a alimentarse con las DMP. La supervivencia total (ST) se calculó como:

$$ST = \frac{JC}{ES} \times 100$$

donde: JC = Juveniles cosechados al final del experimento y ES = Eleuteroembriones sembrados al inicio del experimento.

El porcentaje de supervivencia relativa (SR) se calculó como:

$$SR = \frac{JC}{LD} \times 100$$

donde: JD = Número de larvas al momento de iniciar el destete.

Además, se cuantificó el consumo total de cada una de las tres DMP por parte de las larvas en cada destete.

Asimismo, se realizó una prueba de resistencia (Watanabe, 1989), al final de cada dieta para ambos destetes (destete al día 17 y destete al día 22 DDE) exponiendo al aire por 45 segundos a 10 juveniles por tanque, y dejándolos recuperar por una hora. Se registró el número de peces muertos por cada tanque para conocer el porcentaje de supervivencia al manejo. Todos los juveniles vivos al final de la prueba de resistencia fueron anestesiados, enjuagados y liofilizados con ayuda de un liofilizador Freezone 6 marca Labconco, y almacenados a -80°C para realizarles análisis de ácidos grasos y aminoácidos.

7.2.5. Análisis de ácidos grasos.

Para la extracción de los lípidos totales, se siguió el método de Bligh y Dyer (1959) ajustando las proporciones

de solventes de acuerdo al tamaño de muestra. Se utilizaron de 1 a 3 juveniles de cabrilla arenosa por réplica, los cuales fueron analíticamente analizados por triplicado. Posteriormente, los peces fueron pesados para obtener una cantidad aproximada de 20 mg de muestra seca, éstas fueron maceradas con 3 gotas de solución metanol-cloroformo (en proporción 2:1 v/v) y con ayuda de una varilla de vidrio. Después de la maceración, las muestras fueron mezcladas con 5 ml de una solución de metanol-cloroformo (2:1 v/v) en un primer tubo de ensaye. La mezcla fue sonicada durante dos minutos en un sonicador marca BRONSON modelo 3510, dejándose reposar en refrigeración a 5°C durante una noche. Pasado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm a 5°C / 5 minutos en una centrífuga marca BECKMAN modelo GPR. Posteriormente, se recuperó la fracción líquida con ayuda de una pipeta Pasteur,

y se colocó en un segundo tubo de ensaye con 0.5 ml de cloroformo. Este procedimiento se realizó por triplicado para posteriormente agregar 3 ml de agua destilada. La mezcla fue homogenizada en un agitador tipo Vortex marca Baxter modelo S/P, posteriormente, concentrada en un rotavapor Marca BÜCHI modelo R-14, con ayuda de un matraz pera. El concentrado fue vertido en viales previamente pesados. Se evaporó el cloroformo con ayuda de nitrógeno gaseoso y se pesó el vial para determinar los lípidos totales. Los viales fueron sellados en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos.

Para derivar los lípidos a esteres metílicos de ácidos grasos (FAME: fatty acids methyl esters) se empleó el método de trifloruro de boro (BF_3) descrito en AOAC (1984), en donde se disolvió la muestra contenida en cada vial con 1 ml de solución metanólica de NaOH (0.5 N). Esta mezcla fue vertida, junto con 3 perlas de ebullición, a matraces pera que se encontraban conectados a un sistema de refrigerantes que fueron utilizados para condensar los vapores de los distintos solventes. Se calentó durante cinco a diez minutos (hasta que los glóbulos de grasa dejaron de distinguirse). Se añadieron 1.5 ml de solución metanólica de BF_3 (al 14%) continuando la ebullición por dos minutos, seguido de 1 ml de hexano, manteniendo la ebullición por un minuto. Para separar la fracción lipídica, el matraz fue llenado con una solución saturada de NaCl, extrayendo la capa superior con ayuda de una pipeta Pasteur. Esta fracción fue colocada en un vial de peso conocido. Posteriormente, se evaporó el hexano con nitrógeno gaseoso y se pesó el vial para determinar el contenido de ácidos grasos totales.

La identificación y cuantificación se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro

de masas GS-MS marca Hewlett-Packard (modelo 1800B), utilizando una columna capilar de sílice fundida, empacada con polietilen-glicol como fase estacionaria de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interior X 0.25 μm de espesor (SUPELCO Inc., Bellafonte EEUU, Cat. 2-4136). La temperatura inicial para el programa fue de 250°C en el inyector y 300°C en el detector, estabilizándolos por 6 min. Se utilizó Helio como gas acarreador a una tasa de flujo de 0.9 ml He/min. Se utilizó el integrador del aparato para cuantificar los componentes lipídicos, con ayuda del programa Hewlett-Packard GCD's Chromatogram identifier & libraries.

Se utilizaron dos estándares para la identificación y la comparación de los ácidos grasos. Primero, mediante la preparación de un multiestándar que contenía 28 ácidos grasos conocidos y abundantes en organismos marinos. Así también, para la identificación de los picos restantes, se estableció una comparación entre los tiempos de retención y el área los picos del cromatograma con los ya identificados en el cromatograma de un PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids) estándar Número 1, fuente marina (Supelco, Inc., Bellafonte, EE.UU, cat. 4-7033). El nivel relativo de los ácidos grasos se calculó como el porcentaje del total de los ácidos grasos.

7.2.6. Análisis de aminoácidos.

A tres juveniles alimentados con cada dieta microparticulada, a juveniles alimentados con presas vivas (JAV) y a las propias dietas, se les realizaron el análisis de aminoácidos. Para ello, se les eliminó la grasa con ayuda de un aparato (Soxtec Avanti, Tecator, Suecia). Las muestras desgrasadas fueron molidas con ayuda de una varilla de vidrio y pesadas en una balanza analítica marca Sartorius (precisión 1×10^{-4} g). El perfil de aminoácidos se realizó en el Centro de Productos Bióticos del IPN en, Jojutla Morelos. La técnica empleada se basó

en la hidrólisis de proteínas y péptidos con HCl (0.1N) para la liberación total de aminoácidos. Una vez realizado este primer paso, se realizó una derivatización en una pre-columna, donde se utilizó el reactivo fenilsotiocianato (PITC), para producir feniltiocarbamilo (PTC) aminoácidos (Cohen *et al.*, 1984). Finalmente, el análisis de estos productos fue realizado en un HPLC de fase reversa a 254 nm (Heinrikson y Meredith, 1984). Para determinar deficiencias en el perfil de aminoácidos de los organismos, se calculó el Score químico para cada aminoácido, tomando como perfil de referencia el obtenido para los juveniles alimentados con presas vivas. El score químico se calculó como la cantidad en

miligramos del aminoácido en la muestra problema entre la cantidad en miligramos del aminoácido en la muestra de referencia.

7.2.7. Análisis estadísticos.

A todos los datos se les realizaron pruebas de normalidad y homoscedasticidad; cuando se cumplieron, se aplicaron análisis de varianza de una vía y pruebas posthoc de Tuckey. En los casos donde no se cumplieron los postulados, se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis y pruebas a posteriori de Tukey. Para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v 6.0, con una $P = 0.05$.

7.3. RESULTADOS.

7.3.1. Calidad del agua.

Durante la crianza de las larvas, se registraron valores de temperatura (24.4 ± 0.7 °C), salinidad (36.5 ± 0.7 ‰), oxígeno disuelto (6.3 ± 0.4 mg/l), amonio total (0.2 ± 0.1 ml/l), y nitrito total (0.2 ± 0.1 ml/l), que no fueron atípicos ni afectar el crecimiento ni la supervivencia de las larvas.

7.3.2. Crecimiento de las larvas.

Al analizar los datos de longitud notocordal y/o patrón (Tabla 16) obtenidos de las larvas alimentadas con la DMP a partir del día 17 después de la eclosión, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) hasta el día 30

para las tres DMP. Las longitudes promedio de las larvas alimentadas con la dieta con hidrolizado de proteína de pescado (DH) fueron significativamente mayores a las de las dietas con harina de calamar (DC) y harina de sangre (DS) (Fig. 42).

Los datos de longitud de las larvas destetada a los 22 días después de la eclosión, no mostraron diferencias significativas al día 30, por lo que se continuó el cultivo hasta el día 40. Se encontró una diferencia significativa entre las larvas alimentadas con la DS contra las alimentadas con la DC y DH, siendo estas últimas las que mayores longitudes alcanzaron, y de ellas, la DC fue la que obtuvo mayores longitudes (Fig. 43).

Tabla 16. Longitudes notocordal y/o patrón (promedio en mm $\pm$ desv.est., n=3) de las larvas destetadas con las DMP a los 17 y 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado; DDE – Días después de la eclosión.

Tiempo	Destete a los 17 DDE (17-30 DDE)			Destete a los 22 DDE (22-40 DDE)		
	DC	DS	DH	DC	DS	DH
5	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.2
10	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.3	2.8 ± 0.2
15	4.4 ± 1.0	4.5 ± 0.8	4.5 ± 0.8	4.2 ± 1.0	4.4 ± 1.0	4.0 ± 0.9
20	6.5 ± 0.6	6.3 ± 0.7	6.5 ± 0.8	5.9 ± 1.3	6.9 ± 1.0	6.4 ± 0.9
25	6.4 ± 0.6	6.4 ± 0.6	6.7 ± 0.8	7.3 ± 1.1	7.8 ± 1.1	7.4 ± 1.6
30	8.1 ± 1.3^b	7.8 ± 1.0^b	9.6 ± 1.1^a	9.2 ± 2.0	9.2 ± 1.5	9.8 ± 1.6
40	-	-	-	22.8 ± 0.6^a	14.5 ± 0.1^b	21.2 ± 0.6^a

Superíndices desiguales entre dietas dentro de cada destete, indican diferencias estadísticas $P < 0.05$.

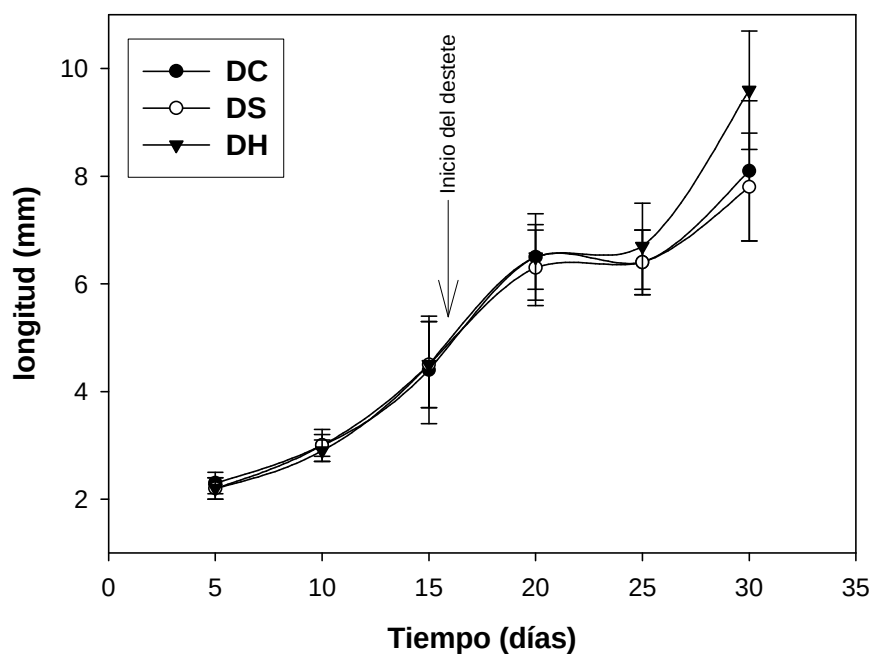


Figura 42. Longitudes notocordal y/o patrón (promedio $\pm$ desv. est.) de las larvas alimentadas con las DMP a partir de los 17 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado.

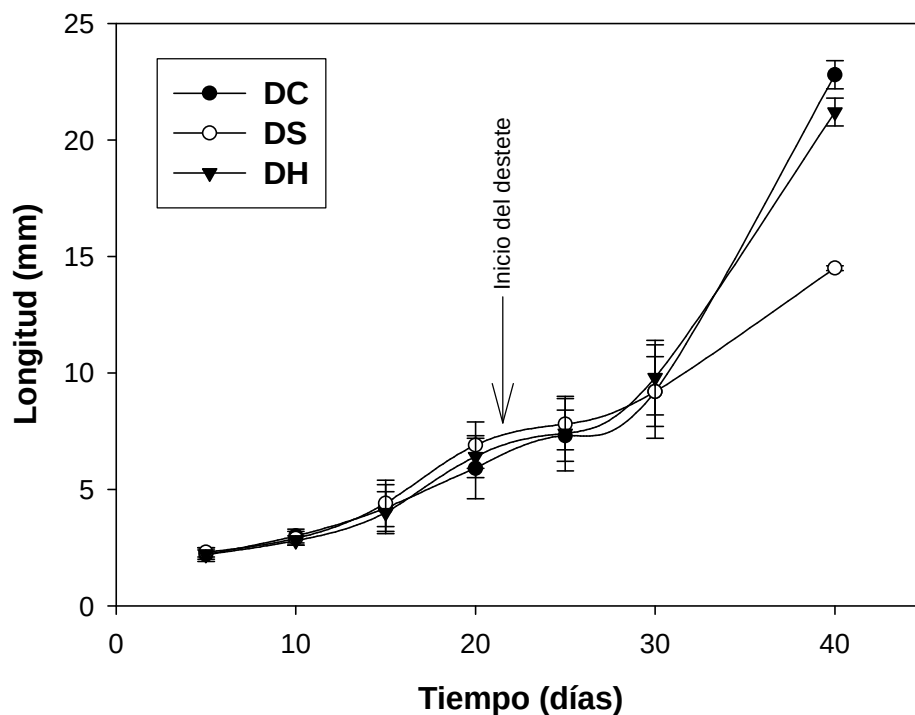


Figura 43. Longitudes notocordal y/o patrón (promedio $\pm$ desv. est.) de las larvas alimentadas con las DMP a partir de los 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado.

En el caso del peso húmedo promedio (Tabla 17) se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) hasta el día 30, para el destete iniciado a los 17 días, donde el peso de las larvas alimentadas con la DH fue mayor al de las larvas alimentadas con la DS y la DC (Fig. 44).

Los pesos promedio de las larvas destetadas a los 22 días después de la

eclosión no fueron diferentes entre las dietas sino hasta el día 40, en que el peso promedio de las larvas alimentadas con la DC fue significativamente mayor al de las larvas alimentadas con la DS ($P < 0.05$). No se encontró diferencia significativa entre los pesos promedio de las larvas alimentadas con la DH y la DC (Fig. 45).

Tabla 17. Pesos (promedio en mg $\pm$ desv. est., $n=3$) de las larvas destetadas con las DMP a los 17 y 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado; DDE – Días después de la eclosión.

Tiempo	Destete a los 17 DDE (17-30 DDE)			Destete a los 22 DDE (22-40 DDE)		
	DC	DS	DH	DC	DS	DH
5	1.0 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2
10	1.5 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.4
15	6.1 $\pm$ 4.1	4.7 $\pm$ 2.9	6.8 $\pm$ 3.6	5.5 $\pm$ 3.7	7.8 $\pm$ 4.1	4.9 $\pm$ 3.0
20	11.7 $\pm$ 4.5	11.7 $\pm$ 4.2	11.7 $\pm$ 3.9	12.1 $\pm$ 7.0	18.4 $\pm$ 7.6	14.5 $\pm$ 6.6
25	13.3 $\pm$ 4.6	13.3 $\pm$ 4.4	13.9 $\pm$ 7.0	23.4 $\pm$ 10.7	26.4 $\pm$ 12.4	25.2 $\pm$ 14.3
30	34.4 $\pm$ 19.9 ^b	29.4 $\pm$ 12.2 ^b	44.7 $\pm$ 16.1 ^a	51.2 $\pm$ 37.1	52.7 $\pm$ 24.1	62.4 $\pm$ 31.7
40	-	-	-	388.4 $\pm$ 67.2 ^a	65.8 $\pm$ 37.8 ^b	279.2 $\pm$ 65.6 ^a

Superíndices desiguales entre dietas dentro de cada destete, indican diferencias estadísticas $P < 0.05$.

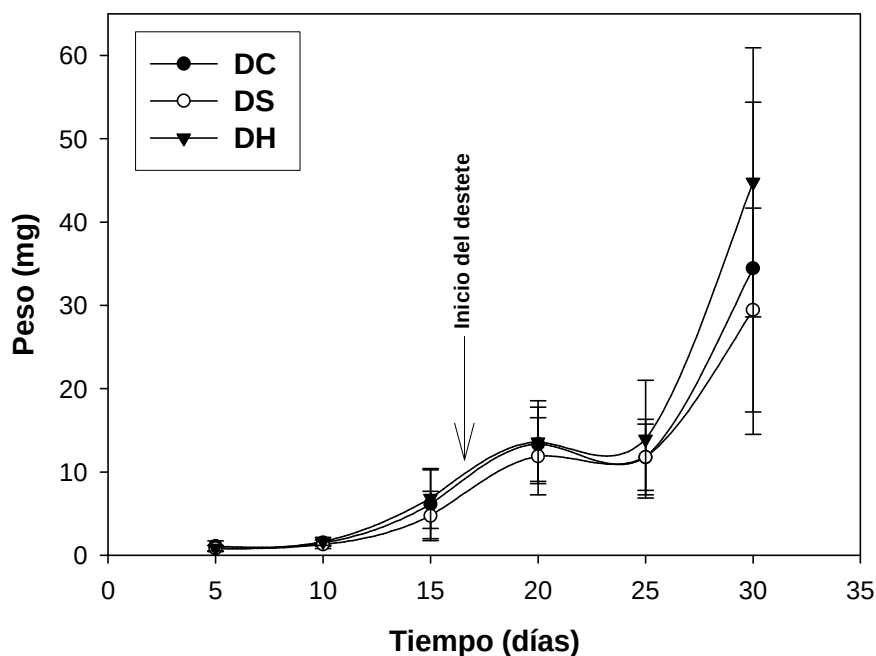


Figura 44. Pesos (promedio en mg $\pm$ desv. est., $n=3$) de las larvas destetadas con las DMP a partir de los 17 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado.

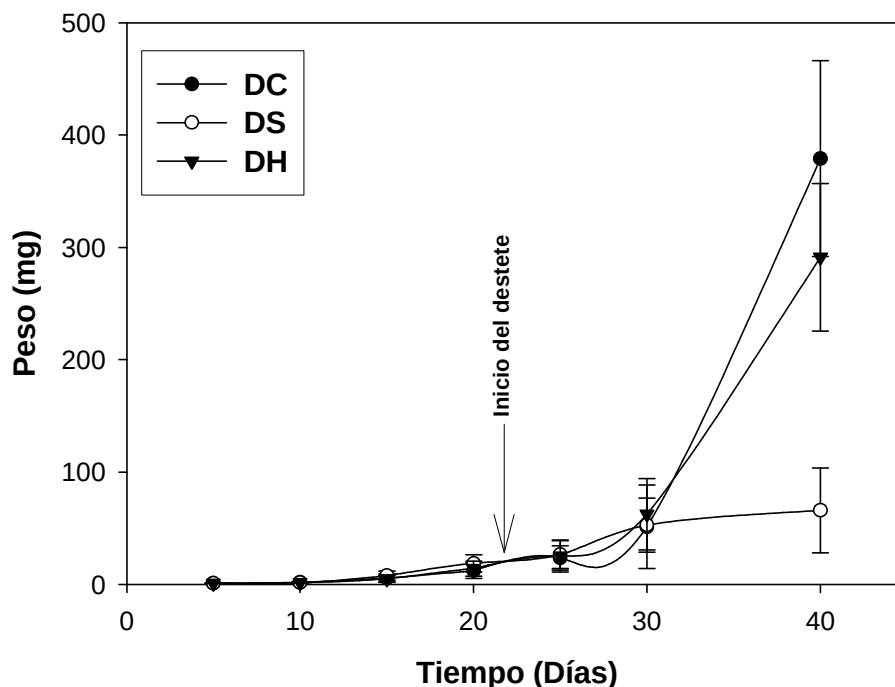


Figura 45. Pesos (promedio en mg $\pm$ desv. est., $n=3$) de las larvas destetadas con las DMP a partir de los 22 días después de la eclosión. DC – Dieta con harina de calamar; DS – Dieta con harina de sangre; DH – Dieta con hidrolizado de proteína de pescado.

7.3.3. Análisis de supervivencia total, relativa, consumo de alimento y prueba de resistencia.

Los porcentajes de supervivencia total, obtenidos al final de cada destete (Tabla 18), no fueron significativamente diferentes entre las DMP ($P > 0.05$). Las larvas alimentadas con la DS mostraron los menores porcentaje de supervivencia (2.0 y 2.8 %) para los destetes iniciados a los 17 y 22 días después de la eclosión, respectivamente. Las larvas alimentadas con la DH tuvieron los

mayores porcentajes de supervivencia con 2.32% y 4.60% para cada destete.

Los porcentajes de supervivencia relativa de las larvas destetadas a los 17 días después de la eclosión no presentaron diferencias significativas entre las dietas ($P > 0.05$), sin embargo, el menor porcentaje de supervivencia relativa las obtuvieron las larvas alimentadas con la DS, mientras que las larvas alimentadas con la DC obtuvieron el mayor porcentaje.

Tabla 18. Porcentajes de supervivencia total, supervivencia relativa, y consumo de alimento (g/día) de las larvas destetadas. DC = Dieta con harina de calamar; DS = Dieta con harina de sangre; DH = Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. D17= Destete a los 17 DDE; D22= Destete a los 22 DDE; DDE = días después de la eclosión.

Dieta	Supervivencia relativa (%)		Supervivencia total (%)		Consumo de alimento (g/día)	
	D17 (17-30 DDE)	D22 (22-40 DDE)	D17	D22	D17 (17-30 DDE)	D22 (22-40 DDE)
DC	37.4 ± 8.6 ^{ns}	59.9 ± 13.6 ^{ab}	2.3 ± 0.8 ^{ns}	4.2 ± 2.0 ^{ns}	0.8 ± 0.6 ^{ns}	2.2 ± 0.2 ^{ns}
DS	21.0 ± 7.7 ^{ns}	40.4 ± 17.9 ^b	2.0 ± 0.3 ^{ns}	2.8 ± 0.6 ^{ns}	0.9 ± 0.3 ^{ns}	2.2 ± 0.1 ^{ns}
DH	28.4 ± 15.7 ^{sn}	80.4 ± 3.2 ^a	2.3 ± 0.2 ^{ns}	4.6 ± 1.1 ^{ns}	0.9 ± 0.3 ^{ns}	2.2 ± 0.1 ^{ns}

Superíndices desiguales entre dietas dentro de cada destete indican diferencia estadística $P < 0.05$.

Los porcentajes de supervivencia relativa de las larvas destetadas a los 22 DDE, presentaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las larvas alimentadas con la DH y las alimentadas con la DS, calculando la mayor supervivencia relativa para las primeras. Las larvas alimentadas con la DC no presentaron diferencias significativas en la supervivencia relativa con las larvas alimentadas con la DH o con la DS. El consumo diario de las tres DMP fue similar y no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguno de los tiempos de destete.

Todos los juveniles cosechados y sometidos a la prueba de resistencia (exposición a 45 segundos al aire) sobrevivieron, independientemente del tipo de alimento y el tiempo de iniciar el destete.

7.3.4. Análisis de ácidos grasos de los juveniles.

La cuantificación de los ácidos grasos de interés, los cuales están

directamente relacionados con la resistencia de los peces al final del experimento son el AA (ácido araquidónico, 20:4 n-6), el EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5 n-3) y el DHA (ácido docosohexaenoico, 22:6 n-3). Las concentraciones de estos ácidos grasos en los juveniles, al final de la prueba de resistencia, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las tres DMP para ninguno de los tiempos de destete. En la Tabla 19 se puede observar que las mayores concentraciones de ácidos grasos las obtuvieron las larvas alimentadas con la DH y la DC en el destete a los 17 días después de la eclosión, mientras que en el experimento de sustitución a los 22 días después de la eclosión, las mayores concentraciones las presentaron las larvas alimentadas con la DH. Asimismo, en esta Tabla se muestran las proporciones entre los eicosanoides encontrados en los juveniles alimentados con las tres DMP en cada tiempo de destete.

Tabla 19. Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de pez en base seca $\pm$ desv. est.) y proporciones de los ácidos grasos encontrados en los juveniles alimentados con las tres DMP en cada destete. DC = Dieta con harina de calamar; DS = Dieta con harina de sangre; DH = Dieta con hidrolizado de proteína de pescado. D17 = Destete a los 17 días después de la eclosión; D22 = Destete a los 22 días después de la eclosión; DDE= días después de la eclosión. AA (ácido araquidónico, 20:4 n-6), el EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5 n-3) y el DHA (ácido docosohexaenoico, 22:6 n-3).

Ácido graso ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de pez BS)	D17 (17-30 DDE)			D22 (22-40 DDE)		
	DC	DS	DH	DC	DS	DH
AA	0.6 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1
EPA	2.5 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.6
DHA	1.9 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.6
Proporciones						
EPA/DHA	1.29	1.30	1.38	1.78	0.96	1.61
AA/DHA	0.33	0.35	0.45	0.31	0.51	0.31
AA/EPA	0.26	0.27	0.32	0.17	0.53	0.19

7.3.5. Análisis de aminoácidos y “score químico” de los juveniles y dietas.

Los aminoácidos solamente pudieron ser analizados en los juveniles que fueron destetados en el día 22 DDE (Tabla 20), ya que la cantidad de muestra requerida para esta técnica no pudo ser obtenida a partir de los juveniles del primer tiempo de destete (17 DDE). El perfil de AA de los organismos, no pudo ser estadísticamente comparado, ya que tampoco fue posible obtener la suficiente cantidad de muestra para hacer varias réplicas. Sin embargo, de manera general, aparentemente los juveniles alimentados con la dieta con hidrolizado proteínico de pescado, tuvieron las más altas concentraciones de AAE (aminoácidos esenciales) y AANE (aminoácidos no esenciales), mientras que aquellos alimentados con la dieta que contenía harina de calamar, mostraron las menores concentraciones, excepto para la metionina que fue menor en los juveniles alimentados con la dieta de sangre de res. Un aspecto que se

debe resaltar, es que en los juveniles alimentados con la DH, no se detectó la presencia de isoleucina (Ile); mientras que para los peces alimentados con la DC no se detectó la presencia de leucina (Leu), y los juveniles alimentados con la DS, carecieron de ambos tipos de aminoácidos.

El resultado del score químico, al tomar como referencia el perfil de aminoácidos de juveniles alimentados con presas vivas, mostró diferencias importantes en la mayoría de los aminoácidos esenciales. A pesar de que en los juveniles alimentados con presas vivas no fueron detectados cuatro aminoácidos, solamente la treonina es considerada dentro de los esenciales para peces marinos. Sin embargo, tanto las dietas como los juveniles alimentados con ellas, mostraron proporciones menores a 1 para la histidina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina, por lo que el total de aminoácidos esenciales de dietas microparticuladas como de los peces alimentados con éstas, fue menor en todos los tratamientos (Tabla 20).

Tabla 20. Perfil de aminoácidos (mg/100 mg de materia seca) y score químico* de las DMP y juveniles de la cabrilla arenera.

Aminoácido (mg/100 mg de materia seca)	DC	DS	DH	JDC	JDS	JDH	JAV	DC-JAV	DS-JAV	DH-JAV	JDC-JAV	JDS-JAV	JDH-JAV
Histidina (His)	2.85	1.74	1.54	1.16	0.78	1.33	2.51	1.1(+)	0.7(-)	0.6(-)	0.5(-)	0.3(-)	0.5(-)
Arginina (Arg)	0.70	2.11	7.79	1.84	7.14	7.56	0.03	25.5(+)	77.3(+)	285.6(+)	67.6(+)	261.7(+)	276.9(+)
Treonina (Tre)	0.69	2.65	7.71	2.69	10.00	10.05	nd	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Valina (Val)	0.28	1.43	0.26	0.69	0.29	0.19	9.48	0.0(-)	0.2(-)	0.0(-)	0.1(-)	0.0(-)	0.0(-)
Metionina (Met)	0.28	0.84	0.38	0.60	0.06	0.24	9.78	0.0(-)	0.1(-)	0.0(-)	0.1(-)	0.0(-)	0.0(-)
Isoleucina (Ile)	nd	3.63	1.44	1.17	nd	nd	4.65	nc	0.8(-)	0.3(-)	0.3(-)	nc	nc
Leucina (Leu)	nd	0.55	0.34	nd	nd	0.14	3.84	nc	0.1(-)	0.1(-)	nc	nc	0.0(-)
Fenilalanina (Fen)	3.91	5.66	6.61	7.85	7.31	7.07	8.66	0.5(-)	0.7(-)	0.8(-)	0.9(-)	0.8(-)	0.8(-)
Lisina (Lis)	1.75	5.33	1.52	6.15	2.13	1.97	7.52	0.2(-)	0.7(-)	0.2(-)	0.8(-)	0.3(-)	0.3(-)
SAAE	10.46	23.93	27.60	22.16	27.70	28.55	46.45	0.2(-)	0.5(-)	0.6(-)	0.5(-)	0.6(-)	0.6(-)
Acido aspártico (Asp)	5.10	1.73	4.35	1.79	6.58	6.21	nd	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Acido glutámico (Glu)	10.17	4.79	11.68	2.55	10.00	10.23	1.63	6.2(+)	2.9(+)	7.2(+)	1.6(+)	6.1(+)	6.3(+)
Serina (Ser)	5.06	3.98	4.41	2.64	3.71	4.80	nd	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Glicina (Gli)	12.09	8.40	13.38	9.29	14.47	13.45	7.03	1.7(+)	1.2(+)	1.9(+)	1.3(+)	2.1(+)	1.9(+)
Alanina (Ala)	7.30	4.72	4.15	3.74	5.68	2.82	5.52	1.3(+)	0.9(-)	0.8(-)	0.7(-)	1.0(=)	0.5(-)
Prolina (Pro)	10.15	21.95	11.52	21.17	8.98	10.55	15.16	0.7(-)	1.4(+)	0.8(-)	1.4(+)	0.6(-)	0.7(-)
Tirosina (Tir)	15.04	1.10	0.42	0.51	0.37	0.23	7.19	2.1(+)	0.2(-)	0.1(-)	0.1(-)	0.1(-)	0.0(-)
Cisteina (Cis)	3.36	1.65	2.66	1.65	2.13	3.44	nd	nc	nc	nc	nc	nc	nc
SAANE	68.26	48.32	52.57	43.34	51.92	51.74	36.54	1.9(+)	1.3(+)	1.4(+)	1.2(+)	1.4(+)	1.4(+)
Total	78.71	72.25	80.17	65.50	79.62	80.29	82.99	0.9(-)	0.9(-)	1.0(=)	0.8(-)	1.0(=)	1.0(=)

DC: Dieta con inclusión de harina de calamar, DS: Dieta con inclusión de harina de sangre de res, DH: Dieta con inclusión de hidrolizado comercial de proteína de pescado. JAV: Juveniles de 40 DDE alimentados con presas vivas (usados como referencia para el cálculo del score químico). JDC: Juvenil de 40 DDE alimentado con la DC, JDS: Juvenil de 40 DDE alimentado con la DS y JDH: Juvenil de 40 DDE alimentado con la DH. (-): menor, (+): mayor, (=): igual. nd: no detectado; nc: no cuantificado.

* Score químico = mg del aminoácido en la muestra / mg del aminoácido en la muestra de referencia. SAAE: Suma total de aminoácidos esenciales, SAANE: Suma total de aminoácidos no esenciales.

7.4. DISCUSIÓN.

7.4.1. Crecimiento y supervivencia.

Durante este experimento la calidad del agua se mantuvo dentro de los intervalos recomendados para el cultivo de larvas de peces marinos (Tucker, 1998), por lo que los efectos en el crecimiento y la supervivencia durante el larvicultivo de la cabrilla arenera fueron atribuidos exclusivamente a las dietas microparticuladas y los tiempos de destete.

Las larvas alimentadas con la dieta con hidrolizado de proteína de pescado (DH) presentaron buenos resultados en crecimiento y supervivencia en ambos tiempos de destete. Esto puede explicarse por el hecho que este ingrediente presenta una gran cantidad de péptidos y una buena cantidad de aminoácidos libres ya que es un producto parcialmente digerido, por lo tanto, su digestión y absorción puede darse con mayor facilidad dentro del tracto digestivo de las larvas peces marinos (Diniz y Martin, 1997; Kolkovski, 2001).

Es posible que la dieta con harina de calamar (DC) y harina de sangre (DS) no hayan dado tan buenos resultados como la DH en el destete a los 17 días después de la eclosión, pues a pesar de que se intentó diseñar dietas isoproteínicas, la DH tuvo 5 % más proteína dietaria que la DC y 2 % más proteína dietaria que la DS. Además, la posible diferencia entre la DH y la DC pudo deberse a que la DC contiene proteínas que no han sido predigeridas como las contenidas en un hidrolizado proteínico, por lo que tienen un mayor nivel de complejidad (Kolkovski y Tandler, 2000). Por lo tanto, las proteínas contenidas en la DC necesitan un gasto mayor de energía para ser digeridas en el recién formado tracto digestivo de las larvas de la cabrilla arenera.

Aunado a esto, Cahu *et al.* (1999) mostraron que la adición

moderada de hidrolizado de proteína de pescado en las dietas de larvas de peces facilita la maduración de los enterocitos del tracto digestivo de las larvas de peces marinos, lo que según Zambonino-Infante *et al.* (1997) puede incrementar el crecimiento y supervivencia de las larvas, debido al menor gasto energético para hidrolizar proteínas.

Por otro lado, Kolkovski (2001) mencionó que las dietas que contienen altas concentraciones de aminoácidos libres (así como los hidrolizados de distintas fuentes de proteína animal) solo toman importancia cuando el sistema digestivo de las larvas se encuentra en desarrollo, pues cuando el tracto digestivo se ha completado, solo una parte de los aminoácidos libres que aportan este tipo de dietas puede ser absorbido, por lo que buena parte del contenido de aminoácidos libres de la dieta se elimina durante la excreción de heces, esto podría explicar que el efecto del destete con la DH fuera más evidente a los 17 DDE que a los 22 DDE. Además, una vez que el estómago se encuentra funcionando, algunos aminoácidos libres no son aprovechados en la absorción (Zambonino-Infante *et al.*, 1997). Weltzien *et al.* (1999) mencionan que la importancia de los aminoácidos, en especial los esenciales, radica en que son la primera fuente de producción de energía aeróbica primaria, lo que permitirá el mantenimiento de las actividades metabólicas basales y su utilización hacia el crecimiento cuando sus requerimientos mínimos han sido cubiertos (Fyhn, 1986).

De acuerdo a Peña-Martínez *et al.* (2003), para el día 16 DDE las larvas de cabrilla arenera ya poseen la mayoría de los elementos estructurales del tracto digestivo bien desarrollados, aunque hasta los 22 DDE se presentan los ciegos pilóricos bien desarrollados, facilitando aún más la digestión enzimática. Es precisamente el

desarrollo de los sacos pilóricos uno de los indicios que consideran autores como Tanaka (1971) y Hamlin *et al.* (2000) como el término del período larvario y el inicio del período juvenil, pues como ya se mencionó, la maduración del sistema digestivo de peces marinos puede expresarse en un mejor crecimiento (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Puede ser por ello que las larvas alimentadas con la DC obtuvieron buenos resultados en el experimento de destete a los 22 DDE, pues según Kolkovski (2001) los juveniles tienen una hidrólisis un tanto más eficiente que las larvas de peces marinos, por lo que pueden aprovechar mejor proteínas más complejas que las presentes en el hidrolizado de proteína de pescado, y no solo depender de los aminoácidos libres que aporta la DH, donde se ha visto que dependiendo del tipo de alimento y el desarrollo de las larvas, la capacidad de asimilación se incrementará, no obstante se ha observado que cuando la larva ha completado su transformación a juvenil tiende a optimizar las fuentes de aminoácidos, reduciendo la concentración y la proporción entre aminoácidos esenciales y aminoácidos libres (Rønnestad *et al.*, 1993; Conceição *et al.*, 1997). Asimismo, la carencia de alimento, ya sea presas vivas o alimentos inertes adecuados, cuando la larva ha consumido sus reservas, resulta en una autólisis de sus tejidos y la eventual muerte del organismo (Fyhn, 1986). Es por todo esto que se considera que el uso de dietas que contengan proteínas predigeridas y con balances de aminoácidos adecuados, permitirá mejorar el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Kråle *et al.*, 2002).

Espe *et al.* (1999) obtuvieron buenos resultados al sustituir 10 % de harina de pescado por hidrolizado de proteínas. Además demostraron que niveles de inclusión mayores o menores no mejoran el crecimiento ni la

supervivencia de las larvas. Asimismo, con la carpa compón y la lubina, se obtuvieron buenos crecimientos con niveles moderados de hidrolizados de pescado, además de observarse la maduración temprana de los enterocitos en las larvas de la lubina (Carvalho *et al.*, 1997; Cahu *et al.* 1999). Sin embargo, dependiendo de la especie, período de crecimiento y tipo de hidrolizado, podrán tener un efecto limitado o nulo sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos, como lo observaron Day *et al.*, (1997) en juveniles del lenguado Dover, así como Kolkovski y Tandler (2000) con larvas de dorada.

En ambos destetes se encontró que los resultados más bajos de longitud notocordal y patrón, así como el peso, los obtuvieron las larvas alimentadas con la dieta con harina de sangre (DS) como sustituto parcial de la harina de sardina. Estos resultados coinciden con lo encontrado por El-Sayed (1998) y Ogunji y Wirth (2001), donde utilizaron a la harina de sangre como fuente de proteína, encontrando poco incremento en peso y longitud de juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Resultados similares fueron encontrados por Colosso *et al.* (1996) para juveniles de *Lates calcarifer*, quienes utilizaron una mezcla de harina de sangre, harina de calamar, harina de pescado, harina de soya y harina de hoja de baya. Así también, Fowler y Banks (1976) determinaron que utilizando una alta inclusión de harina de sangre (cercana al 17%) se presentan anomalías en el tejido hepático, y en consecuencia, una baja tasa de incremento en peso. Riche y Brown (1992) observaron una deficiencia de fósforo en dietas con harina de sangre, el cual es necesario a nivel molecular para procesos energéticos.

Todos estos trabajos se caracterizan por realizar experimentos principalmente en juveniles de varias especies de peces; sin embargo, son

muestra de que a pesar de tener un alto porcentaje proteínico (alrededor de 94%) las dietas que contienen altas concentraciones de harina de sangre utilizadas en la cría de peces presentan varios problemas inherentes a sus componentes, como lo serían las proteínas globulares como fibrina, seroalbúmina o hemoglobina (Lehninger, 1984).

La hemoglobina es la proteína globular que se presenta en una mayor cantidad en la sangre. Posee una estructura cuaternaria, por lo que es también una proteína oligomérica, es decir, se compone de varias unidades proteínicas formando un conjunto globular compacto (Lehninger, 1984). Esta complejidad podría convertir a la hemoglobina en una fuente proteínica difícil de hidrolizar en un tracto digestivo de los peces. Sin embargo, Civera-Cerecedo *et al.* (2002) probaron la digestibilidad *in vitro* de varias harinas animales y vegetales, utilizando extractos multienzimáticos del estómago e intestino de adultos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, observándose un alto grado de digestibilidad para la harina de sangre. El bajo crecimiento y supervivencia larvaria puede ser atribuido a que la harina de sangre debe ser más difícil de digerir en el tracto digestivo de la larva, a pesar de poseer su sistema enzimático completo y funcional. Además, Peña-Martínez *et al.* (2003) mencionan que las larvas de esta especie tienen formado el sistema digestivo casi por completo para el día 16 DDE, aunque aún faltan por completar el desarrollo total de los ciegos pilóricos.

Es también posible que el hierro contenido en la harina de sangre haya provocado un efecto antinutricional para las larvas, ya que este mineral se requiere en niveles traza dentro de los sistemas biológicos y es de suma importancia para la actividad oxido-reductiva, así como para el transporte de oxígeno, pero en cantidades excesivas

afecta estas funciones (Lim *et al.* 2001a). También se ha observado como el hierro modifica el correcto funcionamiento del sistema inmune de peces como *Oncorhynchus mykiss* (Desjardins *et al.*, 1987) o *Ictalurus punctatus* (Sealey *et al.*, 1997).

Los niveles de carencia o exceso del hierro pueden llegar a ser dañinos; sin embargo, el principal problema que presentan los cultivos de peces no es la carencia sino el exceso, esto es debido a que la mayoría de las dietas comerciales y no comerciales suministradas a los peces marinos contienen ciertas cantidades de harina de pescado y/o proteína animal que son fuentes ricas en hierro, el cual puede llegar a dañar el tejido hepático y otros órganos donde se almacena (Fowler y Banks 1976; Lim *et al.* 2001a). Por lo que estudios realizados en varios peces muestran que el requerimiento recomendado de este mineral es entre 30 a 200 mg/kg de dieta (Steffens, 1989; Lall y Oliver, 1993).

Incluso sin haber realizado una medición del hierro en el presente trabajo, resulta muy probable que este mineral se haya presentado en exceso en la DS, ya que la concentración de este mineral en las dietas fue de 1.49 g de sulfato de hierro heptahidratado por kg de dieta, sin considerar el incremento ocasionado por la inclusión de la harina de sangre. Desjardins *et al.* (1987) mencionan que los mayores síntomas de intoxicación por hierro en los peces se detectan con un crecimiento reducido, alta mortalidad (como sucedió en ambos experimentos de sustitución de alimento vivo en los que se utilizó la DS), una pobre conversión alimentaria, un rechazo de la dieta y un daño en las células hepáticas.

Los mismos problemas que anteriormente se mostraron para el crecimiento, se presentan en la supervivencia, pues, si la larva no se alimenta y nutre correctamente no podrá desarrollarse, y por lo tanto morirá.

Según Bernabé y Guissi (1994), el cambio de alimento vivo hacia alimento inerte es uno de los factores de estrés más importantes en la cría de larvas de peces y muchas veces es la principal causa de mortalidad en los cultivos. Este problema se ha venido dando desde los primeros intentos por sustituir al alimento vivo por alimento inerte, y la posible solución que se ha propuesto para este problema es el suministro de alimento vivo a la par con dietas inertes, es decir, la coalimentación. Rosenlund *et al.* (1997) obtuvieron mejores resultados en la supervivencia de *Hipoglossus hipoglossus* cuando se le suministró microdieta en coalimentación con *Artemia*. Hamlin y Kling (2001) lograron también buenos resultados en supervivencia con una coalimentación de siete días. Es por esta razón que se utilizó una coalimentación de al menos tres días en el presente trabajo, tratando de disminuir la mortalidad por el cambio de alimentación.

Aún cuando se haya logrado el consumo de las dietas, existe todavía el problema de los requerimientos por parte de las larvas para poder mantener su desarrollo. Uno de los requerimientos nutricionales más importantes son los ácidos grasos poliinsaturados pertenecientes a la serie n-3, que han sido considerados como uno de los principales responsables de la supervivencia, ya que la carencia de ellos, provoca deficiencias en la adaptación a los cambios de temperatura y la resistencia a agentes extraños (Kanazawa, 1995).

Anteriormente se mencionó que el probable exceso de hierro contenido en la harina de sangre redujo el crecimiento de las larvas; esto también pudo afectar su supervivencia debido a que el hierro en altas concentraciones promueve la rápida oxidación de los ácidos grasos, logrando así su disminución y hasta el daño a nivel de membrana celular (Lim *et al.*, 2001a). Lo anterior, puede ser la razón de que las

larvas alimentadas con la DS hayan mostrado la más baja supervivencia total y relativa, al afectar la calidad de los lípidos dietarios e inclusive disminuir la capacidad atrayente de los aminoácidos libres en la dieta, aunque esto no pudo ser corroborado.

Otro de los requerimientos nutricionales para poder desarrollarse son las proteínas y particularmente los aminoácidos. Su influencia es quizá, no tan directa como la de los ácidos grasos; sin embargo, su deficiencia afecta el crecimiento y el adecuado desarrollo de la larva, pues también son una de las principales fuentes de energía para las larvas, lo que repercutirá en la supervivencia de las mismas (Rønnestad *et al.*, 1999). Debido también al rápido crecimiento y desarrollo en el período larval, el requerimiento de aminoácidos es muy fuerte, y tiene que ser cubierto de manera tal, que permita el crecimiento de las larvas y brinde la suficiente energía para mantener el metabolismo (Tonheim, 2000). Kanazawa *et al.* (1989) mencionaron que para obtener los mejores resultados en tasa de crecimiento y supervivencia es necesario igualar las concentraciones de aminoácidos de la dieta con los del cuerpo de la larva, para así tratar de cubrir sus requerimientos en aminoácidos. Bajo esta idea, la Tabla 1 del apéndice muestra los porcentajes de aminoácidos de los ingredientes utilizados para la formulación y fabricación de las DMP. Estas concentraciones de aminoácidos similares a los de un juvenil de cabrilla arenera, sin embargo, para que una dieta cubra con los requerimientos adecuadamente, se debe considerar la combinación de los ingredientes en la formulación y no solamente la de los ingredientes por separado. Por esta razón, es muy probable que la combinación de ingredientes utilizados en la formulación de las DMP, fuese lo suficientemente adecuada para

completar el perfil de aminoácidos mínimo necesario permitiendo sustentar el crecimiento de las larvas, al menos con la DH y DC.

La falta de información existente sobre los requerimientos alimenticios y nutricionales, así como las condiciones de cultivo de la cabrilla, dificultan el poder optimizar los alimentos y las estrategias alimenticias, así como el implementar diseños experimentales adecuados para mejorar significativamente la supervivencia de las larvas. Es importante mencionar que el presente trabajo forma parte de los primeros intentos por conseguir un adecuado cultivo larvario de la cabrilla arenera utilizando dietas inertes. Por lo mismo, los resultados obtenidos en trabajos como los de Gatesoupe y Luquet (1982), con una supervivencia de cerca del 60% para *Solea solea*; los trabajos de Zambonino-Infante *et al.* (1997) y Cahu *et al.* (1999), con supervivencias de entre 40 a 50 % para *Dicentrarchus labrax*, o los trabajos de Fernández-Díaz *et al.* (1994), Bessonart *et al.* (1999), Kolkovski y Tandler (2000) y Oliva-Teles (2000), mostrando supervivencias no menores a 50% para *Sparus aurata*, demuestran el respaldo de muchos años de investigación en el cultivo que estas especies tienen, mientras que la investigación en el cultivo de la cabrilla arenera se encuentra aún en sus inicios.

Se debe resaltar que el porcentaje de supervivencia total de la larvas a las que se les suministró la DH en el destete a los 22 DDE fue comparativamente mayor que los porcentajes previamente obtenidos por Anguas-Vélez *et al.* (2000a) para la misma especie, donde la supervivencia total obtenida en sus experimentos de destete a los 25 y 30 días DDE resultó ser de $1.7 \pm 0.8 \%$ y $2.7 \pm 0.6\%$ respectivamente. Sin embargo, los resultados de supervivencia obtenidos en el presente trabajo continúan siendo menores a los porcentaje de

supervivencia obtenidos por Alvarez-González *et al.* (2001a), para larvas alimentadas de manera convencional, donde se alcanzó un porcentaje de supervivencia máximo de 11.1%. A pesar de lo anterior, los resultados del presente estudio deben considerarse como un avance significativo en la disminución del suministro de alimento vivo, sustituyéndolo por alimento inerte en menor tiempo a lo que se tiene registrado en experimentos previos realizados por Avilés-Quevedo (1995) y Contreras-Holguín *et al.* (1997).

El presente trabajo debe también considerarse un avance en el cultivo de la cabrilla arenera, pues aunque algunos autores como Rosenlund *et al.* (1997) y Sorgeloos *et al.* (2001) mencionaron que el desarrollo del larvicultivo de peces marinos, a una escala comercial, depende del suministro de alimento vivo (como *Artemia*), otros autores como Cahu y Zambonino-Infante (2001) alientan el uso de dietas inertes como primer alimento para larvas de peces marinos, sí se desea un desarrollo en el cultivo de peces marinos de manera que su producción se torne redituable. Es por ello que la disminución del suministro *Artemia* reditúa en un ahorro de hasta el 40% del costo del cultivo (Baskerville-Bridges y Kling, 2000), debido a que no es necesario la producción masiva de microalgas para alimentar a la *Artemia*. Así también, Hamlin y Kling (2001) mencionaron que cualquier estudio que logre disminuir la dependencia de alimento vivo podría reducir significativamente los cuellos de botella financieros para el proceso del larvicultivo de peces marinos, haciendo a su producción, una meta alcanzable.

7.4.2. Prueba de Resistencia.

La alta resistencia a la prueba de los juveniles de la cabrilla arenera puede ser explicada por dos aspectos: 1) que las concentraciones del ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosapentaenoico (EPA), y el ácido

docosaehexaenoico (DHA) contenidos en las tres DMP utilizadas en los dos destetes, fueron lo suficientemente altas, y por lo tanto, la degradación de los lípidos de la membrana celular por medio de los radicales libres disminuyó, al producirse distintos compuestos, como el glutatión o la α -tocoferol, que reduzcan los radicales libres, convirtiéndolos en compuestos menos reactivos (Hardy, 1999; Olsen *et al.*, 1999)

Izquierdo *et al.* (1989) determinaron que la respuesta al estrés por parte de larvas de *Pagrus major* estaba directamente relacionada con los ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (HUFA), pues si la concentración de ácidos grasos es baja, se provocará un fuerte daño celular antes de poder emitir una respuesta ante el estrés. Es por ello que las concentraciones de estos n-3 HUFA deben considerarse al elaborar una dieta inerte. De manera general, la cantidad recomendada de n-3 HUFA se encuentra entre 1 a 5%, aproximadamente, de peso en base seca. Cada ácido graso tiene un distinto requerimiento, pero una proporción de EPA/DHA se considera adecuada entre 0.5 y 5.6, dependiendo de la especie y condiciones de cultivo (Kanazawa, 1997).

Ako *et al.* (1994) determinaron que un contenido de 10.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de EPA y 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de DHA incluidos en la dieta de larvas de *Mugil cephalus* incrementa en un 98 % de supervivencia de las larvas ante una exposición al aire de 15 segundos. Así también, Weirich y Reigh (2001) mencionaron que proporciones altas de AA/EPA o AA/DHA (como los contenidos en las larvas del presente trabajo) pueden llegar a incrementar la resistencia al estrés oxidativo al lograrse una respuesta rápida de oxidasas que actúan sobre los radicales libres y evitando la oxidación de los lípidos corporales.

2) Que la respuesta a la exposición al aire durante 45 segundos no representó una prueba tan estresante para los juveniles de 45 DDE, al observarse una supervivencia total, por lo que se deberá reevaluar esta prueba, ya que a nivel de crecimiento y supervivencia de las larvas en este experimento, no mejoraron los resultados previamente obtenidos por Alvarez-González (1999) durante el larvicultivo con presas vivas, aunque se haya determinado una mayor mortalidad durante la exposición al aire por 15 segundos; sin embargo, esto puede ser explicado ya que la prueba fue aplicada a juveniles recién transformados de 30 DDE.

7.5. CONCLUSIONES.

El uso de dietas microparticuladas con las características de las diseñadas en el presente trabajo, es adecuado para la crianza larvaria de la cabrilla arenera, pues se logró disminuir el suministro de alimento vivo y obtener juveniles.

Los resultados de longitud, peso y supervivencia lo mostraron que el mejor de los tiempos de destete probados para las larvas de la cabrilla arenera fue a partir de los 22 días después de la eclosión, pues para ese tiempo las larvas cuentan con las enzimas digestivas necesarias y el tracto digestivo está más desarrollado.

Es posible realizar la sustitución parcial de juveniles y adultos de *Artemia* con dietas microparticuladas que contienen 15 % de hidrolizado de proteína de pescado o harina de calamar durante la crianza larvaria de la cabrilla arenera. Sin embargo, se requieren realizar más estudios para optimizar los alimentos inertes, lograr la sustitución total de la *Artemia*, y mejorar los resultados de crecimiento y supervivencia alcanzados con el uso de alimentos vivos.

El hidrolizado de proteína de pescado resultó ser un buen sustituto parcial de la harina de sardina en las dietas microparticuladas, para cuando la sustitución de alimento vivo se realiza antes de los primeros 20 días después de la eclosión. Por su parte, la harina de calamar resultó ser también un buen sustituto parcial de la harina de sardina en las dietas, igualando e incluso superando los resultados del hidrolizado de proteína de pescado cuando se realiza el destete posterior a los 20 días después de la eclosión. Ambos ingredientes poseen una buena cantidad de aminoácidos libres, que posiblemente mejoran la atractabilidad de las dietas y facilitan la absorción de los nutrientes.

Las proporciones de ácidos grasos que las DMP contenían fueron las adecuadas para brindarles a los juveniles

la capacidad de soportar la exposición al aire durante 45 segundos, sin que se presentara mortalidad.

El hierro contenido en la harina de sangre muy probablemente afectó negativamente el crecimiento y la supervivencia de las larvas, por lo que no es recomendable como fuente de proteína en alimentos para la crianza larvaria de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* y posiblemente de otras especies de peces marinos, al menos al nivel de inclusión de 15%.

8. DISCUSIÓN GENERAL.

A partir de esta experiencia, es importante puntualizar algunos aspectos que permitirán comprender la relevancia de este estudio. Como se pudo comprobar, las larvas de la cabrilla arenera presentaron casi todas las enzimas digestivas necesarias para aprovechar el alimento (excepto pepsina hasta el día 12 después de la eclosión), al igual que en numerosos estudios sobre el desarrollo ontogénico del sistema digestivo en las fases larvarias de muchas especies de peces marinos, tales como el lenguado (Clark et al., 1986), rodaballo (Segner et al., 1994), bacalao (Kjørsvik et al., 1991), lubina (Cahu y Zambonino, 1995), dorada (Sarasquete et al., 1993; Yúfera et al., 1993; Moyano et al., 1996) y dentón (Martínez et al., 1997), curvina (Holt, 1993). Asimismo, las larvas de la cabrilla arenera mostraron fluctuaciones importantes en las todas las actividades enzimáticas, como ha sido observado para otras especies. En la mayoría de esos estudios, se observó un incremento progresivo en la actividad de las enzimas digestivas con la edad, aunque en muchos casos puede verse interrumpido temporalmente por descensos bruscos, posiblemente debidos a los cambios morfológicos (maduración del sistema digestivo) y/o nutricionales (cambio de alimentación) que tienen lugar durante los distintos estadios del desarrollo larvario (Holt, 1993; Ueberschar, 1993). No es sorprendente, dado el alto contenido proteínico tanto en las presas vivas como en las dietas inertes, que una gran proporción de los trabajos científicos versen exclusivamente sobre las proteasas digestivas (Douglas et al., 1999). Se ha comprobado que la actividad más temprana corresponde a proteasas alcalinas, lo que resulta lógico dado que la actividad proteasa ácida está estrechamente relacionada con la aparición de un estómago

funcional, que tienen lugar más tardíamente durante el desarrollo como fue demostrado en la cabrilla arenera.

Por otro lado, se han puntualizado los principales eventos en el desarrollo del sistema digestivo de las larvas de la cabrilla arenera (Peña-Martínez et al., 2003), lo que ha permitido entender y seleccionar, en conjunto con la aparición e incremento de las actividades enzimáticas digestivas en este estudio, los tiempos de destete más adecuados para la alimentación con dietas inertes. Govoni et al. (1986) ha resaltado que la completa formación del sistema digestivo es un indicador claro de la transformación a juvenil y si a esta información se le anexa la aparición de las actividad enzimáticas digestivas, es posible evaluar la capacidad que tienen las larvas de las distintas especies para utilizar dietas artificiales como en este estudio. Por ejemplo, en todos los casos (a excepción del rodaballo) se detecta actividad proteasa alcalina antes de la apertura de la boca, lo que demuestra que antes de ingerir su primer alimento las larvas comienzan a desarrollar su equipamiento enzimático. En todos los casos, existe un período relativamente corto entre la apertura de la boca y el desarrollo de un estómago funcional. Dado el papel crucial que tiene el estómago en la digestión proteínica, los altos niveles de proteasas alcalinas detectados en los primeros días de vida en algunas de estas especies podrían compensar la carencia de estómago.

El estudio de la evolución de las principales actividades enzimáticas digestivas (proteasas, amilasas, lipasas, etc.) durante el desarrollo larvario puede proporcionar una información muy útil para evaluar el estado general del cultivo. Con este propósito se emplearon diversas técnicas bioquímicas y electroforéticas (basadas en el uso combinado de sustratos, inhibidores específicos y electroforesis en geles de poliacrilamida) que

permitieron conocer de manera más detallada y precisa el tipo y niveles de enzimas digestivas presentes en cada momento del desarrollo larvario de la cabrilla arenera. Estos estudios resaltaron que esta especie presenta un equipo enzimático completo desde la eclosión, el cual se va desarrollando gradualmente y varía en función del desarrollo y la adición de los alimentos vivos.

Algunos ejemplos de estos estudios se han llevado a cabo con las larvas de barramundi *Lates calcarifer*, las cuales al principio tienen un tubo recto y para el día 11 después de la eclosión está completamente formado. Desde el punto de vista fisiológico, la actividad tipo tripsina está presente desde el principio y varía en cantidades durante las primeras semanas desapareciendo totalmente para el día 30 (Walford y Lam, 1993). Asimismo, se ha descrito en numerosos estudios que la actividad de las enzimas digestivas en el momento de la eclosión es muy baja y podría ser debida a las enzimas proteolíticas que intervienen en la rotura del corion (Luczynski et al., 1987). No obstante, sus niveles se incrementan progresivamente con la edad, aunque este incremento paulatino puede estar interrumpido por descensos bruscos, que posiblemente estén relacionados con los cambios morfológicos (maduración del sistema digestivo) o nutricionales (cambio de alimentación) durante el desarrollo de la larva (Holt, 1993; Ueberschär, 1993). Generalmente, las larvas pueden controlar parcialmente la secreción de enzimas de acuerdo con la composición del alimento y su tasa de consumo. En cualquier caso, las pautas enzimáticas que aparecen durante el desarrollo se deben a la interacción de factores genéticos y nutricionales (Buddington et al., 1997). Moyano et al. (1996), detectaron en larvas de la dorada *Sparus aurata* la actividad proteasa alcalina desde el inicio de la

alimentación exógena, y la aparición y fluctuaciones del resto de las enzimas (lipasa, amilasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, fosfatasas) en los días subsiguientes. Además, en el día 40 DE, se detectó la presencia de proteasas ácidas, dando inicio la secreción de HCl y pepsina. Al comparar estos resultados con los de otras especies se determinó que el desarrollo de sus enzimas fue similar al de especies con afinidad templada.

Aunado a lo anterior, la caracterización de proteasas en los juveniles de la cabrilla arenera, demostró que existen varios tipos de proteasas alcalinas con parámetros operacionales similares a las observadas en otras especies. Presentaron una buena cantidad de isoformas con la capacidad de hidrolizar proteínas a pH alcalino y una sola proteasa que hidroliza a pH ácido. Esta información se realizó a través de los estudios electroforéticos los cuales representan una herramienta fundamental en la valoración y caracterización del equipamiento enzimático digestivo. Generalmente, en la mayoría de los peces la actividad digestiva más ampliamente estudiada corresponde a las proteasas digestivas, lo que parece razonable dada la importancia de la proteína en sus dietas que llega a ser de hasta un 50 % (Díaz et al., 1997), sin embargo se puede hacer extensiva a otras enzimas digestivas tales como la actividad amilasas y lipasa.

Mediante estas técnicas electroforéticas se pudo hacer un seguimiento de la evolución ontogénica de las enzimas digestivas a lo largo del desarrollo larvario de la cabrilla arenera y se determinó que desde el día 12 después de la eclosión se puede realizar el destete, aunque basándose en los datos morfológicos del estudio de Peña-Martínez et al. (2003) se consideraron los días 17 y 22 después de la eclosión para iniciar el destete

temprano. Con la cual se confirmó la presencia de dos enzimas diferentes con actividad caseinolítica (degradan la caseína) al inicio de la alimentación exógena y un incremento en su número a medida que crecen las larvas de dorada y dentón.

En el destete del dentón (sobre el día 32 de cultivo larvario) se comprobó que estaban presentes todas las bandas detectadas en los ejemplares juveniles (animales con sus capacidades digestivas plenamente desarrolladas). Por el contrario, las larvas de dorada con 30 días mostraron solamente tres proteasas comparadas con las siete de los ejemplares juveniles. Confirmando los resultados obtenidos con inhibidores específicos, en ninguno de los zimogramas larvarios se observa la presencia de las proteasas presentes en el alimento vivo, lo que manifiesta tan sólo un posible efecto cualitativo de estas últimas en el proceso digestivo de las larvas.

Por otra parte, una vez que estos estudios básicos sobre el desarrollo de enzimas digestivas en las larvas de la cabrilla arenera y la caracterización se conocieron, fue posible aplicar técnicas de digestibilidad *in vitro* para evaluar diversos ingredientes proteínicos a fin de desarrollar dietas inertes en función de esos cambios enzimáticos, lo que permitió seleccionar a la harina de calamar, la harina de sangre de res y el hidrolizado de pescado como ingredientes adecuados para formular dietas inertes durante el destete temprano de las larvas. Son pocos los estudios donde se haya aplicado ese conocimiento básico, para el diseño de dietas. Algunos de estos estudios han sido realizados por el grupo de investigadores de la Universidad de Almería, donde a través del uso del pH Stat, se ha evaluado la digestibilidad *in vitro* de ingredientes animales y vegetales en varias especies de peces, en diferentes períodos de desarrollo, lo

que en conjunto con los estudios de digestibilidad *in vivo*, han permitido mejorar de manera importante las formulaciones de las dietas que actualmente se utilizan en el cultivo comercial de peces marinos (Moyano *et al.*, 1996; Alarcón, 1997; Díaz *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Alarcón *et al.*, 2000; Moyano y Savoi, 2001).

Las dietas microparticuladas que se desarrollaron utilizando las harinas seleccionadas mejoraron los resultados que previamente Anguas-Vélez *et al.* (2001) obtuvieron, donde se incrementó el crecimiento y la supervivencia de las larvas, además de lograrse eliminar el adulto de Artemia, el cual es un alimento difícil de mantener (por las altas cantidades de microalgas que consumen y por la variabilidad nutricional que presenta), con lo que se ha logrado un avance importante en el diseño de dietas para larvas de la cabrilla arenera, ya que como es bien sabido, desde un punto de vista nutricional, el alimento vivo no siempre es el más adecuado. Es común que el suministro de este tipo de alimento puede verse interrumpido por problemas en su cultivo ocasionados por múltiples factores. Por ejemplo, la calidad nutritiva y precio de los nauplios de Artemia puede variar en función del lugar de origen de los quistes (Versichelle *et al.*, 1989), igualmente en varias ocasiones se han descrito como vectores de ciertas enfermedades que han causado serios problemas en el cultivo (parásitos, bacterias, virus, etc.). Además, en un cultivo masivo de alimento vivo se requiere espacio, energía, mano de obra, etc.

Es por esto que consideramos que el uso de dietas artificiales ofrece una alternativa totalmente importante por su fácil disponibilidad, más bajos costos de producción, mayor flexibilidad en las fórmulas y la posibilidad de adelantar el destete, si se conoce la capacidad digestiva de las larvas. A pesar de todas estas ventajas, los

esfuerzos por sustituir las presas vivas por alimento inerte sólo han tenido un éxito parcial, tanto en lo que se refiere al número de especies a las que se puede aplicar, como a la supervivencia obtenida. De la misma manera que en otras especies de peces marinos, el destete realizado en las larvas de la cabrilla arenosa todavía no ha logrado mejorar las tasas de crecimiento, ni la supervivencia alcanzadas al utilizar alimento vivo, por lo que es necesario profundizar aún más en el uso de microdietas, ya que se ha visto que algunas de las limitaciones están relacionadas con el tiempo en el que se inicia el destete y la capacidad digestiva de la larva en ese momento (Van Damme *et al.*, 1989; Köck y Hofer, 1989; Holt, 1993; Walford y Lam, 1993).

Algunos autores han propuesto, como solución a la baja digestibilidad encontrada con este tipo de alimentos, la elaboración de microcápsulas que incorporen aminoácidos libres en mayor cantidad, así como moléculas de bajo peso que puedan ser fácilmente absorbidas por los enterocitos de las paredes intestinales. A esta solución se planteó el inconveniente de que las técnicas de elaboración de microcápsulas implican la existencia de poros en las cubiertas que ocasionarían la pérdida de tales sustancias al exterior por lavado en el agua. Es por esto que los últimos estudios proponen el diseño de microcápsulas más complejas que tengan la capacidad de liberar atrayentes de bajo peso molecular, tales como aminoácidos libres, con objeto de aumentar la ingestión por parte de la larva pero que a su vez retengan con mayor eficacia vitaminas, minerales y en general su contenido nutritivo (Ozkizilcik y Chu, 1996).

A pesar de todos estos inconvenientes las expectativas futuras en este campo son bastante prometedoras, sobre todo por el uso de técnicas *in vitro* que facilitan en gran medida el diseño de dietas

microencapsuladas mucho más eficaces. Recientemente se ha sustituido totalmente en un cultivo larvario de dorada el alimento vivo por una dieta microencapsulada elaborada de acuerdo con una serie de orientaciones obtenidas mediante este tipo de ensayos. Los resultados obtenidos son bastante alentadores ya que las tasas de crecimiento registradas son similares a las de un lote control alimentado con presas vivas (Yúfera *et al.*, 1996). Ya sea a través del uso de microcápsulas u otras alternativas como la utilización de técnicas de coalimentación, incluyendo sustancias de alta atractabilidad en las dietas (Rønnestad *et al.*, 2001), la adición de enzimas exógenas que faciliten su digestión (Kolkovski *et al.*, 1993; Kolkovski *et al.*, 1997a) o por medio del uso de probióticos que permitan la maduración temprana del sistema digestivo de las larvas (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Tovar-Ramírez *et al.*, 2002); el avance en el diseño de dietas para la alimentación de larvas de peces marinos es evidente.

Se puede concluir que los conocimientos recabados durante el desarrollo de esta tesis son un avance importante para que en un futuro el cultivo de la cabrilla arenosa se una realidad, abriendo la posibilidad de iniciar el cultivo de peces marinos en México, tal como se desarrollo para muchas otras especie de peces marinos, por medio del control y conocimiento exhaustivo del proceso de alimentación y nutrición durante el desarrollo fisiológico de los peces (Alarcón-López y Díaz, 1998).

9. RECOMENDACIONES.

Desde el punto de vista de la nutrición de las larvas de peces, el cual involucra el proceso de ingestión, digestión y absorción, se recomienda lo siguiente:

a) Ingestión.

Profundizar en los estudios que involucren el comportamiento alimenticio de las larvas de la cabrilla arenosa, a fin de comprender la manera en la que se ven atraídas por las presas y las cazan, lo que permitirá visualizar si es factible controlar este comportamiento a través de alguna alternativa tecnológica que permita diseñar dietas adecuadas en tamaño e inclusive con movimiento para atraer a las larvas a que las consuman.

El conocimiento de la cantidad de presas que son consumidas por las larvas, lo que permitirá optimizar a su vez, el uso de micropartículas durante la alimentación. Además, hacer un estudio profundo de todas aquellas sustancias presentes en los alimentos vivos, a fin de aplicar este conocimiento y diseñar dietas inertes que las contengan.

Optimizar métodos de coalimentación de las micropartículas y presas, con el objetivo de disminuir al mínimo la utilización de los alimentos vivos durante la crianza de las larvas. Asimismo, profundizar en los estudios sobre el papel que juega el agua (humedad) en la ingesta y digestión de los alimentos, ya que existe una diferencia muy importante entre la cantidad de agua contenida en las presas (> 80 %), comparada con las dietas inertes que tienen de 10 a 30 % de humedad, lo cual puede ser una limitante para la alimentación de las larvas.

El posible uso de otro tipo de presas vivas (copépodos), que remplacen el uso de rotíferos y *Artemia*, con lo que se cubrirían de manera más eficaz los requerimientos nutricionales de las larvas y se podrían mejorar la supervivencia y el crecimiento de las larvas.

b) Digestión.

En este aspecto, existe aun mucho trabajo por hacer, ya que aunque

se conozca la ontogenia enzimática de la especie, sería recomendable conocer, desde la perspectiva molecular, el momento en el que se activan los genes que codifican para las enzimas digestivas, además de estudiar más a fondo este tipo de moléculas, haciendo su purificación, caracterización y secuenciación, para determinar si existen otro tipo de enzimas digestivas que pudiesen tener alguna aplicación industrial.

Continuar con los estudios de digestibilidad *in vitro* aplicados a las larvas, a fin de determinar la digestibilidad de una mayor cantidad de ingredientes proteínicos y lipídicos que puedan ser utilizados en la alimentación de las larvas, y su correlación con pruebas *in vivo*. Asimismo, utilizar técnicas de microencapsulación de los ingredientes de alta digestibilidad y otros componentes, para lograr eliminar en su totalidad el uso de presas vivas.

El empleo de probióticos como levaduras, para la alimentación y posible maduración del sistema digestivo, aplicando las técnicas propuestas por Zambonino-Infante, con estudios específicos en relación a las enzimas del borde de cepillo y del citoplasma. Además del posible uso de las técnicas de micromanipulación, para determinar el papel que juegan los diferentes aminoácidos en la alimentación de las larvas.

c) Absorción.

En las larvas de la cabrilla arenosa falta realizar trabajos relacionados con la absorción de nutrientes, ya que en este campo existen limitaciones, como es el uso de técnicas de radiomarcaje que han sido aplicadas en otros países, con lo que se ha logrado entender la forma en que las moléculas son absorbidas y transportadas a las diferentes partes del cuerpo, pero que son difíciles de implementar en nuestro país.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abousalham, A. y R. Verger. 2000. Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases. *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 56-62.
- Adler-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.* 24, 1090-1093.
- Aguilera-González, C.J. 1999. Bases fisiológicas del desarrollo de larvas de catán (*Atractosteus spatula*) y perspectivas para su cultivo. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 186 pp.
- Ako, H., C.S. Tamaru, P. Bass y C.S. Lee. 1994. Enhancing the resistance to physical stress in larvae of *Mugil cephalus* by feeding of enriched *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 122, 565-573.
- Alarcón, F.J., F.J. Moyano y M. Díaz. 1995. Digestión proteica en peces marinos: Una visión general. pp. 455-460. En: Castelló-Orvai, F. y Calderer-Reig, A. (Eds.). *Proceedings of the Fifth National Congress on Aquaculture*. Sant Carles de la Ràpita, 10-13 Mayo. Universidad de Barcelona, España.
- Alarcón, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, España. 187 pp.
- Alarcón, F., J.M. Díaz, F.J. Moyano y E. Abell. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol. Biochem.* 19, 257-267.
- Alarcón, F.J. y M.I. Martínez-Díaz. 1998. Fisiología de la Digestión en Larvas de Peces Marinos y sus Aplicaciones al Cultivo Larvario en Masa. *AQUANIC* 5, 1-14.
- Alarcón-López, F.J., F.J. Moyano, M. Díaz, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 1999a. Optimization of protein fraction of microcapsule used in feeding of marine fish larvae using in vitro digestibility techniques. *Aquaculture Nutrition* 5, 107-113.
- Alarcón-López, F.J., F.J. Moyano y M. Díaz. 1999b. Effect of inhibitors in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat. Living Resour.* 12, 233-238.
- Alarcón, F.J., T.F. Martínez, M. Díaz y F.J. Moyano. 2001. Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydrobiologia* 445, 199-204.
- Albro, P.W., R.D. Hall, J.T. Corbett and J. Schroeder. 1985. Activation of nonspecific lipase (E.C. 3.1.1.-) by bile salts. *Biochim. Biophys. Acta* 835, 477-490.
- Alliot, E., A. Pastoureaud y J. Trellur. 1977. Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*). Variations des protéinogrammes et des zymogrammes, *Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci.* 4, 85-91.
- Alvarez-González, C.A. 1999. Optimización del proceso de producción de cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 108 pp.
- Alvarez-González, C.A., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, S.F. Martínez-Díaz, D.E. Hernández-Ceballos, T. Grayeb del Alamo, M. Moreno-Legorreta, R. Peña-Martínez y R. Civera-Cerecedo, 2001a. Effect of stocking density on the growth and survival sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J. World Aquacult. Soc.* 32, 130-137.
- Alvarez-González, C.A., R. Civera-Cerecedo J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta y T. Grayeb-Del Alamo. 2001b. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture* 194, 151-159.
- Alvarez-González, C.A., H. Nolasco-Soria, R. Civera-Cerecedo, S. Dumas, J.L. Ortiz-Galindo, M.O. Rosales-Velázquez. 2001c. Development of some digestive enzymes

- in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. pp. 44-47. En: Larví'01- Fish and Shellfish Larviculture Symposium. C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille y P. Sorgeloos (Eds.). European Aquaculture Society, Special Publication No. 30. Oostende, Bélgica.
- Andrews, A.T. 1995. Electrophoresis: Theory, techniques, biochemical and clinical applications. Clarendon Press. Oxford, Great Britain. 452 pp.
- Anguas-Vélez, B.H., R. Civera-Cerecedo, M. Cadena-Roa, J. Guillaume y S.F. Martínez-Díaz. 2000a. Studies on the nutrition of spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*. Effect of the dietary protein level on growth and protein use in juveniles fed semipurified diets. Aquacult. Nutr., 31,580 -591.
- Anguas-Vélez, B.H., R. Civera-Cerecedo, M. Contreras-Olguin, R.A. Rueda-Jasso y J. Guillaume. 2000b. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. J. App. Aqua. 10,1-15.
- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22, 79-89.
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry (ISH), 963-965.
- AOAC, 1995. 16th ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, vol. I, Washington, D.C. USA, 1234 pp.
- Archibal, A.L. 1987. Comparison of the serum amylases of farm animals. Biochem. Physiol. 88B, 963-968.
- Arunchalam, K. y N. F. Haard. 1985. Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). Comp. Biochem. Physiol. 80B, 467-473.
- Ásgeirsson, B. y J.B. Bjarnasson. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. Comp. Biochem. Physiol. 99B, 327-335.
- Ásgeirsson, B., R. Hartemink y J.F. Chlebowski. 1995. Alkaline phosphatase from atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties wich indicate adaptation to low temperatures. Comp. Biochem. Physiol. 110B, 315-329.
- Ásgeirsson, B., R. Leth-Larsen, M. Thórolfsoon, M.M. Nedertoft y P. Højrup. 1998. The third serine proteinase with chymotrypsin specificity isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*) is a type-II elastase. Eur. J. Biochem. 255, 638-646.
- Avilés-Quevedo, A., U. McGregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Hiraes-Cosio, M. Huerta-Bello y M. Iizawa. 1995. Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868). SEPESCA México, 85 pp.
- Baglolle, C.J., G.P. Goff y G.M. Wright. 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. J. Fish Biol. 53, 767-784.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 113,178-185.
- Baraggi, V. y R.T. Lovel. 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. Trans. Am. Fish. Soc. 115, 478-484.
- Barnabé, G. y A. Guissi. 1994. Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food feeding regime. Aquacult. Fish. Manag. 25, 573-546.
- Barrington, E.J.W. 1957. The alimentary canal and digestion. pp. 105-161. En: M.E. Brow (Ed.). The Physiology of Fishes. Vol 1, Academic Press, NY.
- Baskerville-Bridges, B. y L.J. Kling. 2000. Early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae onto a microparticulate diet. Aquaculture 189,109-117.
- Behal, F.J., B. Asserson, F. Dawson y J. Hardman. 1965. A study of human tissue aminopeptidase components. Arch. Biochem. Biophys. 111, 335-344.

- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière y R. Verger. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 133, 133–153.
- Benitez, L. V. y L.B. Tiro. 1982. Studies on digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos*. *Mar. Biol.* 71, 309–315.
- Bernabé, G. y A. Guissi. 1994. Adaptation of the feeding behavior of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food regime. *Aqua. Fisher. Man.* 25, 537-546.
- Bessonart, M., M.S. Izquierdo, M. Salhi, C.M. Hernández-Cruz, M.M. González y H. Fernández-Palacios. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Bjarnason, J.B., E.O. Mäntylä y B. Ásgeirsson. 1993. Purification and characterization of proteolytic digestive enzymes from pyloric caeca of Atlantic cod. pp. 240-246. En: Walther, B.T. y Fyhn, H.J. (Eds.). *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Univ. Bergen, Norway.
- Blaxter, J.H.S. 1988. Pattern and variety in development. pp 1-58. En: *Fish Physiology*, Vol. XIA (Hoar, W.S. y Randall, D.J., eds.). Academic Press, San Diego.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Boissen, S. y B.O. Eggum, 1991. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple stomach animals. *Nutr. Res. Rev.* 4, 141-162.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 72, 248-254.
- Bassompierre, M., T. Borresen, P. Sandfeld, B. Ronsholdt, W. Zimmermann y E. Mclean. 1997. An evaluation of open and closed systems for in vitro protein digestion of fish meal. *Aquacult. Nutr.* 3, 153-159.
- Brewer, P., N. Helbig y N.F. Haard. 1981. Atlantic cod pepsin - Characterization and use as a rennet substitute. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 17, 38-43.
- Brinkmeyer, R.L. y G.L. Holt. 1998. Highly unsaturated fatty acids in diets for red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 161, 253-268.
- Bryant, P.L. y A.J. Matty. 1981. Adaptation of carp (*Cyprinus carpio*) larvae to artificial diets: 1. Optimum feeding rate and adaptation age for a commercial diet. *Aquaculture* 23, 275-286.
- Buchet, V., J.L. Zambonino-Infante y C.L. Cahu. 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 184, 339-347.
- Buddington, R., 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvencens*, during early development. *J. Fish Biol.* 26, 715-723.
- Buddington, R., A. Krogh y A.M. Bakke-Mckellep. 1997. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relation with diet. *Acta Physiol. Scand.* 161, 67-80.
- Cadena-Roa, M.A. y G. Roldán-Libenson. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de cabrilla. SEPESCA-UABCS. México. 93 pp.
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213-222.
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431-437.

- Cahu, C. 1996. Nutrition des larves de poisson; 1. Développement des enzymes digestives et modifications induites par l'aliment. Journées INRA-IFREMER, Nutrition des Poissons 21-22 fév. Saint-Pée-sur-Nivelle.
- Cahu, C. y J.L. Zambonino-Infante. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. *Aquacult. Int.* 5, 151-160.
- Cahu, C., J.L. Zambonino-Infante, A.-M. Escaffre, P. Bergot y S. Kaushik. 1998. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 169, 1-7.
- Cahu, C., J.L. Zambonino-Infante, P. Quazuguel y M.M Le Gall. 1999. Protein hydrolyzate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109-119.
- Cahu, C. y J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.
- Canioni, P., R. Julien, J. Rathelot y L. Sarda. 1977. Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids*, 12, 393-397.
- Cañavate, J.P. y C. Fernández-Díaz. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255-263.
- Cara-Torres, J.B., F.J. Moyano, C. Fernández-Díaz, M. Yúfera. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). *CIVA* 1, 110-121.
- Carvalho, A.P., A.-M. Escaffre, A. Oliva-Teles y P. Bergot. 1997. First feeding of common carp with levels of protein hydrolysates. *Aquacult. Int.* 5, 361-367.
- Caruso G. y L. Genovese. 1992. Attività enzimatica nell'apparato digerente di *Seriola dumerilli* (Risso, 1810) in allevamento intensivo. pp. 45-50. En: Proceedings of XXIII Congress S.I.B.M., Ravenna.
- Chakrabarti, I., M.A. Gani, K.K. Chaki, R. Sur y K.K. Misra. 1995. Enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A, 167-177.
- Cheung, A.L., P. Yung y V.A. Fschetti. 1991. A method to detect proteinase activity using unprocessed X-ray films. *An. Biochem.* 193, 20-23.
- Chong, A.S.C., R. Hashim, L.-C. Lee y A.b. Ali. 2002a. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciatus* larva. *Aquacult. Research.* 33, 663-672.
- Chong, A.S.C., R. Hashim, L. Chong-Yang y A.B. Ali. 2002b. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysidon aequifasciata*). *Aquaculture* 203, 321-333.
- Chong-Carrillo, O. y F. Vega-Villasante. 2003. El camarón: Diccionario de camaronicultura. Versión 1.0, CIBNOR-Universidad de la Habana.
- Chu, F.-L.E. y S. Ozkizilcik. 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 237, 1-9.
- Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter, G. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219-1227.
- Civera-Cerecedo, R., H. Villarreal, E. Goytortúa, S. Rocha, F. Vega, H. Nolasco, J. Pastén y T. Camarillo. 1999. La langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína en dietas experimentales para camarón. pp 325-347. En: Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D. y Mendoza, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola III. Memorias del

- Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 11 al 13 de Noviembre de 1996. Monterrey, N. L., México.
- Civera-Cerecedo, R., E. Goytortúa, S. Rocha, H. Nolasco, F. Vega-Villasante, E. Balart, E. Amador, G. Ponce, G. Colado, J. Lucero, C. Rodríguez, J. Solano, A. Flores-Tom, J. Monroy y G. Coral. 2000. Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. pp. 349-365. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C. J., Rique Marie, D y Cruz Suárez, L. E. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del Cuarto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-18 Noviembre de 1998. La Paz, México.
- Civera-Cerecedo, R., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, H. Nolasco-Soria, C.A. Alvarez-González, B. Anguas-Vélez, R. Peña-Martínez, M.O. Rosales-Velázquez, V. Carrasco-Chávez, R. García-Gómez y E. Goytortúa-Bores. 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. pp. 352-406. En: Cruz-Suárez L.E., Rique Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds.), VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 3 al 6 de Septiembre de 2002, Cancún, Quintana Roo, México.
- Clark, J., K.R. Murray y J.R. Stark. 1986. Protease development in dover sole (*Solea solea* (L.)). *Aquaculture* 53, 253-262.
- Cohen, S.A., T.L. Tarvin, B.A. Bidlingmayer y G.E. Tarr. 1984. Analisis of amino acids using pre-column derivatization with phenylisothiocynate. *Am. Lab.* 48, 1-5.
- Cohen, T., A. Gertler y Y. Birk. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase. *Comp. Physiol. Biochem.* 69B, 639-646.
- Collins, A.L. y T.A. Anderson. 1997. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. *J. Fish Biol.* 50, 1158-1165.
- Colosso, R., J.R. Hipolito y D. Murillo. 1996. Screening of inexpensive and indigenous ingredients for use in practical feed for juvenile sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). Feeds for small-scale aquaculture. Proceedings of the National Seminar-Workshop on Fish Nutrition and Feeds. Tigbauan, Iloilo, Philippines, 1-2 Junio 1994. SEAFDEC, Philippines, pp. 119.
- Connell, J.J., 1980. Control of Fish Quality. Fishing New Books. Farnham UK.
- Contreras-Holguín, M., R.A. Rueda-Jasso, E. Matus-Nivon, J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas y M. Osorio-Galindo. 1997. Crianza de larvas y juveniles de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. En: Ramírez-Resendiz, G. (Ed.), V Congreso Nacional de Ictiología, Mazatlán, Sinaloa, México, 3-7 Febrero 1997.
- Conçeição, L.E.C., T. van del Meeren, J.A.A. Verreth, M.S. Evjen, D.F. Houlihan y H.J. Fyhn. 1997. Amino acid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton and Artemia. *Mar. Biol.* 129, 255-265.
- Cousin, J.C.B., F. Baudin-Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30, 15-33.
- Cox, E.S. y P.M. Pankhurst. 2000. Feeding behaviour of greenback flounder larvae, *Rhombosolea tapirina* (Günther) with differing exposure histories to live prey. *Aquaculture* 183, 285-297.
- Culling, C.F.A. 1974. Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques. 3ª edición. Butterworth, Londres.
- Cuvier-Péres, A. y P. Kestemont. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 279-285.

- Czesny, S., S. Kolkovski, K. Dabrowski y D. Culver. 1999. Growth, survival, and quality of juvenile walleye *Stizostedion vitreum* as influenced by n-3 HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 178, 103-115.
- Dabrowski, K. 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.* 7, 73-76.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: present state of the art and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 24, 807-833.
- Dabrowski, K., F. Takashima, C. Strüssmann y T. Yamazaki 1986. Rearing of coregonid larvae with live and artificial diets. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 52, 23-30.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Day, O.J., B.R. Howell y D.A. Jones. 1997. The effect of hydrolised fish protein concentrate on survival and growth of juvenile Dover sole *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquacult. Res.* 28, 911-921.
- Deplano, M., R. Connes, J.P. Díaz y G. Bernabé. 1991. Variation in the absorption of macromolecular proteins in larvae of sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Mar. Biol.* 115, 29-36.
- Desjardins, L.M., B.D. Hicks y J.W. Hilton. 1987. Iron catalyzed oxidation of trout diets and its effect on the growth and physiological response of rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 3, 173-182.
- Devillers, C. 1961. Structural and dynamic aspects of the development of the teleostean egg. *Adv. Morphol.* 1, 379-428.
- Dhert, P., M. González-Félix, K. Van Rieckeghem, I. Geurden, F. Thysen, E. Lebegue, P. Lavens y P. Zorruelos. 1999. Cofeeding of phospholipids to turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae as a tool for reduce live food consumption. *Aquacult. Nutr.* 5, 237-245.
- Díaz, J.P., L. Mani-Ponset, C. Blasco y R. Connes. 2002. Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat. Living Resour.* 15, 196-178.
- Díaz-López, M., F.J. Moyano-López, L.F. García-Carreño, F.J. Alarcón y M.C. Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Inter.* 5, 461-471.
- Díaz, M., F.J. Moyano, F.J. Alarcón, F.L. García-Carreño y M.A. Navarrete del Toro. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B, 369-377.
- Diccionario esencial de las ciencias, 2000. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. ESPASA, Madrid, España, 1022 pp.
- Dimes, L.E. y N.F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 349-362.
- Dimes, L.E., F.L. García-Carreño y N.F. Haard. 1994a. Estimation of protein digestibility. III. Studies on digestive enzyme from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 349-360.
- 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.T. Higgs. 1994b. Estimation of protein digestibility. II. In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 363-370.
- Diniz, F.M. y A.M. Martin. 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 30, 266-272.
- Dixon, M. y E. Webb. 1979. *Enzymes*. 3ª edición, Academic Press. New York.

- Douglas, S.E., A. Gawlicka, S. Mandla y J.W. Gallant. 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish Biol.* 55, 897-915.
- Douglas, S.E., S. Mandla y J.W. Gallart. 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during the development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190, 247-260.
- Dumermuth, E., J. Bond, A. Flannery y R. Beynon. 1991. The astacin family of metalloendopeptidases. *J. Biol. Chem.* 266, 21831-21835.
- Dunn, B.M. 1989. Determination of protease mechanism. pp. 57-81. En: R.J. Beynon y J.S. Bond (Eds.). *proteolytic Enzymes: A practical approach*. I.R.L. Press, Oxford, England
- Dupuis, Y., S. Tardival, Z. Poremska y P. Fournier. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem.* 23, 175-180.
- Eggum, B.O., I. Hansen y T. Larsen. 1989. Protein quality and digestibility energy of selected food determined in balance trials with rats. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 39, 13-21.
- Ehrlich, K.F., M.C. Cantin, M.B. Rust y B. Grant. 1989. Growth and survival of larval and postlarval smallmouth bass fed a commercially prepared dry feed and/or *Artemia* nauplii. *J. World Aqua. Soc.* 20, 1-6.
- Eid, A.E. y A.J. Matty. 1989. A simple *in vitro* method for measuring protein digestibility. *Aquaculture*, 79, 111-119.
- Einarsson, S.P. y S. Davies. 1996. On the localization and ultrastructure of pepsinogen, trypsinogen and chymotrypsinogen secreting cells in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 114B, 295-301.
- El-Sayed, A.F.M., 1998. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. *Aquacult. Res.* 29, 275-280.
- Engen, P.C. 1968. Organogenesis in the walleye surfperch, *Hyperprosopon argenteum* (Gibbons). *Calif. Fish Game* 54, 156-169.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Escaffre, A.M., J.L. Zambonino-Infante, C.L. Cahu, M. Mambrini, P. Bergot y S.J. Kaushik. 1997. Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 153, 63-80.
- Eshel A, P. Lindner, P. Smirnoff, S. Newton y S. Harpaz. 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 627-34.
- Espe, M., H. Sveier, I. Høggø, y E. Lied. 1999. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. *Aquaculture* 174, 119-127.
- Evans, R.P., C.C. Parrish, P. Zhu, J.A. Brown y P.J. Davis. 1998. Changes in phospholipase activity and lipid content during early development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mar. Biol.* 130, 369-376.
- Ezquerria, J.M., 1997. Enzyme technology in aquaculture; *in vitro* evaluation of enzymatic digestibility of dietary proteins by pH-stat for the optimization of diets for cultured *Penaeus vannamei*, Tesis doctoral, CIBNOR, La Paz, México 137 pp.
- Fange, R. y D. Grove. 1979. Digestion, pp. 161-260. En: W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett (Eds.). *Fish Physiology*. Vol. 8, Academic Press. NY.
- FAO, 2001. Fishstat Plus v2.30: Universal software for fisheries statistical time series.

- Fernández-Díaz, C., E. Pascual y M. Yúfera. 1994. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. Mar. Biol. 118, 323-328.
- Fernández-Díaz, C., M. Yúfera, J.P. Cañavete, F.J. Moyano-López, F.J. Alarcón-López y M. Díaz-López. 2001a. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. J. Fish Biol. 58, 1086-1097.
- Fernández, I., F.J. Moyano, M. Díaz y T. Martínez. 2001. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 262, 1-12.
- Fernández-Millán, A. 1996. Evaluación de dietas con inclusión de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente proteica. Efectos sobre la sobrevivencia y el crecimiento de juveniles del camarón café (*Penaeus californiensis*). Tesis de Licenciatura. Ingeniero en Acuicultura. ITMAR- Guaymas-Extensión La Paz. 63 pp.
- Ferry, L.A., S.L. Stephens y G.M. Cailliet. 1997. Food habits of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*, Serranidae) from Bahia de Los Angeles, Baja California. Bull. Southern California Acad. Sci. 96, 1-21.
- Finn, R.N. y H.J. Fyhn. 1995. Metabolic fuels in developing cod and halibut embryos and larvae. ICES Mar. Sci. Symp. 201, 70-73.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.A. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico-oriental. FAO vol. 3, 1813 pp.
- Fish, G.R. 1960. The comparative activity of some digestive enzyme in the alimentary canal of tilapia and perch. Hydrobiologia 15, 161-178.
- Ford, J.E. y D.N. Salter. 1966. Analysis of enzymatically digested food proteins by Sephadex-gel filtration. Br. J. Nutr. 20, 843-860.
- Fowler, L.G. y J.L. Banks. 1976. Animal and vegetable substitutes for fish meal in the Abernathy diet, 1973. Progr. Fish-Cult. 38, 123-126.
- Fraisse, M., N.Y.S. Woo, J. Noaillac-Depeyre y J.C. Murat. 1981. Distribution pattern of digestive enzymes activities in the intestine of the catfish (*Ameiurus nebulosa* L.) and of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Comp. Biochem. Physiol. 70A, 443-446.
- Fraser, A.J., J.C. Gamble y J.R. Sargent. 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). Mar. Biol. 99, 307-313.
- Fukusho, K. 1972. Organogenesis of digestive system in the mullet, *Liza haematocheila*, with special reference to gizzard. Jpn. J. Ichthyol. 19, 283-294.
- Fyhn, H.J. 1986. First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy?. Aquaculture 80, 111-120.
- Fyhn, H.J., 1993. Multiple functions of free amino acids during embryogenesis in marine fishes. pp. 299-308. En: B.T. Walther & H.J. Fyhn (Eds.). Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development. Univ. Bergen, Norway.
- Fyhn, H.J. y J.J. Govoni. 1995. Endogenous nutrient mobilization during egg and larval development in two marine fishes – Atlantic menhaden and spot. ICES Mar. Sci. Symp. 201, 64-69.
- Galicia-González, A. 2001. Determinación del valor nutritivo de un hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. UNAM-Iztacala. 78 pp.
- García-Carreño, F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. Biotechnol. Education 3, 145-150.
- García-Carreño, F.L., L.E. Dimes y N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Anal. Biochem. 214, 65-69.

- García-Carreño, F.L., C. Albuquerque-Cavalcanti, M.A. Navarrete del Toro y E. Zaniboni-Filho. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects on protein quality. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B, 343-352.
- García-Ortega, A., J.A.J. Verreth, P. Coutteau, H. Segner, E.A. Huisman y P. Sorgeloos. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161, 501-514.
- García-Ortega, A., J. Verreth y H. Segner. 2000. Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 237-244.
- Gatesoupe, F.J. y P. Luquet. 1982. Weaning of the sole (*Solea solea*) before metamorphosis. *Aquaculture* 26, 359-368.
- Gawlicka, A., B. Parent, M.H. Horn, N. Ross, I. Opstad y O.J. Torrinsen. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184, 303-314.
- Gawlicka, A., C.T. Leggiadro, J.W. Gallant y S.E. Douglas. 2001. Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J. Fish Biol.* 529-536.
- Georgopoulou, U., M.F. Sire y J.M. Vernier. 1985. Macromolecular absorption of proteins by epithelial cells of the posterior intestinal segment and their intracellular digestion in the rainbow trout. Ultrastructural and biochemical study. *Biol. Cell.* 53, 269-282.
- Geurden, I., O.S. Reyes, P. Bergot, P. Coutteau y P. Sorgeloos. 1998a. Incorporation of fatty acids from dietary neutral lipid in eye, brain and muscle of postlarval turbot fed diets with different types of phosphatidylcholine. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 365-375.
- Geurden, I., P. Bergot, L. Schwarz y P. Sorgeloos. 1998b. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly-weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 217-228.
- Gjellesvik, D.R. 1991. Enzymatic lipid digestion in teleosts: bile salt-dependent lipase as major lipolytic enzyme in cod pancreas. Tesis doctoral, Bergen, Noruega, Universidad de Bergen.
- Gjellesvik, D.R., D. Lombardo y B.T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 123-134.
- Glass, H.J., N.L. MacDonald y J.R. Stark. 1987. Metabolism in marine flatfish – IV. Carbohydrate and protein digestion in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A, 281-289.
- Glass, H.J., N.L. MacDonald, R. Munilla-Morán y J.R. Stark. 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 607-611.
- Govoni, J.J. 1980. Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.* 39, 69-80.
- Govoni, J.J., G.W. Boehlert y Y.L. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59-77.
- Goytortúa-Bores, E. 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura. Ingeniería en Alimentos. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 112 pp.
- Goytortúa-Bores, E. 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla *Pleuroncodes planipes* para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima. 86 pp.

- Grabner, M. 1985. An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture* 48, 97-110.
- Grabner, M. y R. Hofer. 1985. The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under in vitro conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 48,111-122.
- Grayeb-Del Alamo, T., J.L. Ortiz-Galindo, R. Civera-Cerecedo y S. Dumas. 1998. Effect of density on growth and survival during the nursery and growout of spotted sand bass in floating sea cages. *Aquicultura Brasil* 98. Recife, 2-6 nov. 1998.
- Guerard, F. y Y. Le Gal. 1987. Characterization of a chymosinlike pepsin from the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 823-827.
- Gutierrez-Leyva, R. 2003. Calidad nutricional de dos productos a base de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína o aditivo alimentario en alimentos balanceados para juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de licenciatura en Biología Marina. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 102 pp.
- Haard, N.F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aquatic Food Product Technol.* 1, 17-35.
- Hamlin, H.J., I.H. Von Herbing y L.J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish Biol.* 87, 716-732.
- Hamlin, H.J. y L.J. Kling, 2001. The culture and early weaning of larval haddock *Melanogrammus aeglefinus* using a microparticulate diet. *Aquaculture* 201, 61-72.
- Han, K., I. Geurden y P. Sorgeloos. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183, 335-347.
- Hardy, R.W. 1989. Practical feeding salmon and trout. pp. 185-203. En: T. Lovell (Ed.). *Nutrition and Feeding in Fish*. Van Nostrand Reinhold, A VI, NY.
- Hardy, R.W., 1999. Problems and opportunities in fish feed formulation. *Aqua. Mag.* 25, 1-4.
- Hardy, R.W. 2000. New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements. pp. 216-226. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán., Mexico.
- Harel, M., S. Ozkizilcik, E. Lund, P. Behrens y A.R. Place. 1999. Enhanced absorption of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) in *Artemia* nauplii using a dietary combination of DHA-rich phospholipids and DHA-sodium salts. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B, 169-176.
- Harris, H. 1989. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186, 133-150.
- Heinrikson, R.L. y S.C. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase High-Performance liquid chromatography: pre.column derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136, 65-71.
- Henning, S.J., D.C. Rubin y R.J. Shulman. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. pp. 571-610. En: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3^a Edición, Raven Press, New York.
- Hernández-González, G. 1999. Evaluación del valor nutricional de una harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*), fabricada a nivel industrial, como insumo protéico en dietas para camarones peneidos. Maestría en Ciencias con especialidad

- en Cultivo de Crustáceos. Programa Regional de Posgrado en Acuicultura. Universidad de Sonora. 60 pp.
- Heussen, C. y E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of palminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytic. Biochem.* 102, 196-202.
- Hidalgo, M.C., E. Urea y A. Sanz. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
- Hiramatsu, N. y A. Hara. 1996. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.* 115A, 243-251.
- Hirikado, M., K. Hirata, Y. Uemarsu, Y. Hatooka y M. Kazama. 1994. Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 35, 28-33.
- Hirji, K.N. y W.A.M. Courtney. 1983. Non-specific carboxylic esterase activity in the digestive tract of the perch *Perca fluviatilis* L. *Fish. Soc. British Isles* 23, 1-7.
- Hjelmeland, K., I. Huse, T. Jorgensen, G. Molvik y J. Raa. 1983. Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Flodevigen Rapp.* 3, 1-17.
- Hjelmeland, K., B.H. Pedersen y E.M. Nilssen. 1988. Trypsin content in intestine of herring larvae, *Clupea harengus*, ingested inert polystyrene spheres or live crustacean prey. *Mar. Biol.* 98, 331-335.
- Hoehne-Reitan, K., E. Kjorsvik, y K.I. Reitan, 2001a. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. *J. Fish Biol.* 58, 746-754.
- Hoehne-Reitan, K., E. Kjorsvik, y D.R. Gjellesvik, 2001b. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. *J. Fish Biol.* 58, 737-745.
- Hofer, R. y A.N. Uddin. 1985. Digestive process during the development of the roach, *Rutilus rutilus* L. *J. Fish Biol.* 26, 683-689.
- Holt, G. J. y F. Sun. 1991. Lipase activity and total lipid content during early development of red drum *Sciaenops ocellatus*. *European Aquaculture Society, Special Publication* 15, 30-33.
- Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *J. World Aquac. Soc.* 24, 225-230.
- Hsu, H.W., D.L. Vavak, L.D. Satterlee y G.A. Miller. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42, 1269-1273.
- Hubbs, C.L. 1958. *Dikellorhynchus* and *Kanazawaichthys*: nominal fish genera interpreted as base on juveniles of *Malacanthus* and *Antennarius*, respectively. *Copeia* 1958, 282-285.
- Hunter, E.J. 2001. Studies on the effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* 36, 655-667.
- Igbokwe, E.C. y A.E.R. Downe. 1978. Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 60B, 131-136.
- Iijima, N., N. Tanaka y Y. Ota. 1998. Purification and characterisation of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59-69.
- Iwai, T. 1968a. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - V. Fat absorption in the gut epithelium of goldfish larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sei. Fish.* 34, 973-978.
- Iwai, T. 1968b. Fine structure and absorption patterns of intestinal epithelial cells in rainbow trout alevins. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 91, 366-379.

- Iwai, T, R. y M. Tanaka. 1968a. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - III. Epithelial cells in the posterior gut of halfbeak larvae. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 34, 44-48.
- Iwai, T, R. y M. Tanaka. 1968b. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - IV. Absorption of fat by the gut of halfbeak larvae. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 34, 871-875.
- Izquierdo, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of culture marine fish larvae. Aquacult. Nutr. 2, 183-191.
- Izquierdo, M.S. y R.J. Henderson. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. Fish Physiol. Biochem. 19, 153-162.
- Izquierdo, M.S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C.M. Hernández-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Physiol. Biochem. 22, 97-107.
- Jancarik, A., 1964. Die verdauung der hauptnaehrstoffe beim karpfen. Z. Fisch. Deren Hilfswiss. 12, 602-684.
- Jensen, R. G. 1983. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. Lipids. 18, 650-657.
- Jónás, E., M. Rágyanszki, J. Oláh y L. Boross. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.) herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. Aquaculture 30, 145-154.
- Kageyama, T. 2002. Pepsinogens, prostricins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. Cell. Mol. Life Sci. 59, 288-306.
- Kanazawa, A., 1995. Nutrition of Larval Fish. pp. 50-59. En: Lim, C. E. y Sessa, D. J. (Eds.), Nutrition and utilization technology in aquaculture. AOCS press, EUA.
- Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. Aquaculture 155, 129-134.
- Kanazawa, A., S. Koshio y S.-I. Teshima. 1989. Growth and survival of larvae red sea bream *Pagrus major* and japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. J. World Aquacult. Soc. 20, 31-37.
- Kapoor, B.G., H. Smit y I.A. Verighina. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. pp. 109-211. En: F.S. Rusell y M. Yonge (Eds.). Advances in Marine Biology. Vol. 13, Academic Press. London.
- Kawai, S. y S. Ikeda. 1973a. Studies on digestive enzymes of fishes III. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 39, 819-823.
- Kawai, S., y S. Ikeda. 1973b, Studies on digestive enzymes of fishes – IV. Development of the digestive enzymes of carp and red sea bream after hatching. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 39, 877-881.
- Kendall, A.W., E.H. Ahlstrom y H.G. Moser, 1984, Early life history stnps of Fishes and their characters. pp. 11-24, En: H.G. Molser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall & S.L. Richardson (Eds.). Ontogeny and Systematics of Fishes, Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publi. 1. Lawrence.
- Kestemont, P., J. Cooremans, A. Abi-Ayad y C.M. Lard. 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch (*Perca fluviatilis*): variations with developmental stage and spawning period. Fish Physiol. Biochem. 21, 59-64.
- Kitamikado, M. y S. Tachino. 1960. Studies on the digestive enzymes of rainbow trout proteases. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 2, 685-690.
- Kjørsvik, E., T. Van der Meer, H. Kryvi, J. Arnfinnson y P.G. Kvenseth. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. J. Fish. Biol. 38, 1-15.

- Kjørsvik, E. y A.L. Reiersen. 1992. Histomorphology of the early yolk-sac larvae of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) - an indication of the timing of functionality. J. Fish Biol. 41, 1-19.
- Knights, M. 1985. Energetics and fish farming. pp. 309-340. En: P. Tytler and P. Calow (Eds.). Fish Energetics, New Perspectives. Croom Helm. London y Sydney.
- Kolkovski, S., A. Tandler, G.Wm. Kissil y A. Gertler. 1993. The effect of dietary exogenous enzymes on ingestion assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12, 203-209.
- Kolkovski, S., A. Tandler y M.S. Izquierdo. 1997a. Effect of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 148. 313-322.
- Kolkovski, S., A. Arieli y A. Tandler. 1997b. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. Aquacult. Int. 5, 527-536.
- Kolkovski, S., W. Koven y A. Tandler. 1997c. The mode of action of Artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture 155, 193-205.
- Kolkovski, S. y A. Tandler. 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquacult. Nutr. 6, 11-15.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture 200, 181-201.
- Kostomarova, A.A. 1962. Effect of starvation on the development of the larvae of bony fishes. Tr. Inst. Morfol. Zhivotn. Severtsova Akad. Nauk. SSSR 40, 4-77.
- Koven, W., Y. Barr, S. Lutzky, I. Ben-Atia, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens y A. Tandler. 2001a. The effect of dietary arachidonic acid 20:4n-6 on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture 193, 107-122.
- Koven, W., S. Kolkovski, E. Hadas, K. Gamsiz y A. Tandler. 2001b. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture 194, 107-121.
- Kråle, A., T. Harboe, M. Espe, T. Næss y K. Hamre. 2002. Effect of predigested protein on growth and survival of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture Research 33, 311-321.
- Krieger, J. y R. Fleig. 1999. Yolk mobilization in perch, *Perca fluviatilis* L., embryos. Fish Physiol. Biochem. 21, 157-165.
- Kristinsson, H.G. y B.A. Rasco. 2000a. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Food Sci. Nutr. 40, 43-81.
- Kristinsson, H.G. y B.A. Rasco. 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. J. Agric. Food Chem. 48, 657-666.
- Kristinsson, H.G. y B.A. Rasco. 2000c. Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from Atlantic salmon (*Salmo salar*) pyloric caeca. J. Food Biochem. 24, 177-187.
- Krogdahl, A. y A. Sundby. 1999. Characteristics of pancreatic function in fish. pp. 437-458. En: Pierzynowski, S.G., Zabielski, R. (Eds.), Biology of the Pancreas in Growing Animals. Elsevier Science, Amsterdam.
- Köck, G. y R. Hofer. 1989. The effect of natural and artificial diets upon trypsin activity of roach (*Rutilus rutilus*) and whitefish (*Coregonus sp.*) larvae. Pol. Arch. Hydrobiol. 36, 443-453.
- Kubota, M. y A. Ohnuma. 1970. Studies on bonito pepsin. Enzymic properties of Bonito pepsin. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 36, 1147-56.

- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol. 30, 291-310.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1996. Formation of a diffuse pancreas and the development of digestive enzymes synthesis in larvae of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 141, 267-276.
- Kurokawa, T., M. Shiraishi y T. Suzuki. 1998. Quantification of exogenous proteases derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanoticus*) larvae. Aquaculture 161, 491-499.
- Kuz'mina, V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleost. Aquaculture 148, 25-37.
- Kuz'mina, V., L. Glatman, V. Drabkin y A. Gelman. 2003. Amylolytic activity in fish intestinal mucosa: temperature effects. Comp. Biochem. Physiol. 134B, 529-534.
- Lacks, S.A. y S.S. Springhorn. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulfate. J. Biol. Chem. 255, 7467-7473.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lall, S.P. y G. Olivier. 1993. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish. pp. 101-118. En: Fish nutrition in practice. INRA. París.
- Lan, C.C. y B.S. Pan. 1993. In vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 109, 59-70.
- Lauff, M. y R. Hofer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335-346.
- Lazo, J., R. Romaine y R. Reigh. 1998. Evaluation of the in vitro enzyme assays for estimating protein digestibility in the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 29, 441-450.
- Lazo, J.P., 1999. Development of the digestive system in red drum *Sciaenops ocellatus* larvae. Tesis doctoral. Universidad de Texas en Austin, Austin, Texas, E.U.A.
- Lehninger, A.L. 1984. Bioquímica. 2ª ed. Omega. Barcelona, España. 1198 pp.
- Lie, O. y G. Lambertsen. 1985. Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morhua*): Fatty acid specificity. Comp. Biochem. Physiol. 80B, 447-450.
- Lim, C., P.H. Klesius y C.A. Shoemaker. 2001a. Dietary iron and fish health. pp.189-198. En: Lim C. y Webster C.D. (Eds.), Nutrition and fish health. FP Publishers, EUA.
- Luczynski, M., J. Strzelecki y P. Brzuzan. 1987. Secretion of hatching enzyme and its proteolytic activity in coregoninae (*Coregonus albula* L and *C. lavaretus* L) embryos. Fish Physiol. Biochem. 4, 57-62.
- Mackie, I.M. 1982. Fish protein hydrolyzates. Proc. Biochem. 17, 26-37
- Malacinski, G.M. y W.J. Rutter, 1966. Multiple molecular forms of the amylase from the human saliva. Biochem. 11, 4382-4390.
- Maraux, S., D. Louvard y J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. Biochim. Biophys. Acta 321, 282-295.
- March, B.E., C. Macmillan y F.W. Ming. 1985. Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 47, 275-292.
- Martínez, M.I., F.J. Alarcón, M.R. Dehesa y A. García. 1997. Evolución del equipamiento enzimático digestivo a lo largo del desarrollo larvario del dentón (*Dentex dentex*). pp. 509-514. En: Actas VI Congr. Nac. Acuicultura.
- Martínez, I., F.J. Moyano, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiol. Biochem. 21, 317-323.

- Martínez, T.F., F.J. Alarcón, M. Díaz-López y F.J. Moyano-López. 2000. Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *Electrophoresis* 21, 2940-2943.
- Martínez-Díaz, S.F. 1995. Estudio de una enfermedad hemorrágica ulcerativa en un lote de reproductores de cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (Eteindachner, 1868): Osteichthyes, Serranidae. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. México. 94 pp.
- Mathews, C.K. y K.E. Van Holde. 1998. *Bioquímica*, Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Mcdonough, F.E., G. Sarwar, F.H. Steinke, P. Slump, S. García y S. Boisen. 1990. In vitro assay for protein digestibility: interlaboratory study. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 73, 622-625.
- Merchie, G., P. Lavens, Ph. Dhert, M. Dehasque, H. Nelis, A. De Leenheer y P. Sorgeloos. 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organism. *Aquaculture* 134, 325-337.
- Merchie, G., P. Lavens, Ph. Dhert, M. García-Ulloa-Gómez, H. Nelis, A. De Leehneer y P. Zorruelos. 1996. Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae. *J. Fish Biol.* 49, 573-583.
- Merchie, G., P. Lavens y P. Sorgeloos. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155, 165-181.
- Moyano, F.J., M. Diaz, F.J. Alarcon y M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 121-130.
- Moyano, F.J., F.J. Alarcón y M. Díaz. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. *Comp. Biochem. Physiol.* 5, 135-143.
- Moyano-López, F.J., I. Martínez-Díaz, M. Díaz-López y F.J. Alarcón-López, 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122B, 327-332.
- 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.* 128A, 359-368.
- Munilla-Morán, R., J.R. Stark y A. Barbour. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in culture of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*. 88, 337-350.
- Munilla-Morán, R. y F. Saborido-Rey. 1996a. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from red fish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 395-402.
- Munilla-Morán, R. y F. Saborido-Rey. 1996b. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and red fish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 827-834.
- Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes. pp. 1-13. En: Beynon, R y Bond, J.S. (Eds.). *Proteolytic Enzymes*. IRL Pres Oxford. UK.
- Noda, M. y K. Murakami. 1981. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. *Biochem. Biophys. Acta* 65B, 27-34.
- Norris, E.R. y D.W. Elam. 1940. Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. *J. Biol. Chem.* 134, 443-54.

- O'Connell, C.P. 1976. Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. Exp. Mar. Biol. Ecol. 25, 285-312.
- O'Connell, C.P. 1981. Development of organ systems in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other teleosts. Amer. Zool. 21, 429-446.
- Ogunji, J.O. y M. Wirth. 2001. Alternative protein sources as substitutes for fishmeal in the diet of young tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). Isr. J. Aquacult. Bamidgeh. 53, 34-43.
- Ohkubo, N. y T. Matsubara. 2002. Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. Mar. Biol. 140, 187-196.
- Oliva-Teles, A., 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. Aquac. Inter. 8, 477-492.
- Olsen, R.E., E. Løvaas y Ø. Lie. 1999. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). Fish Physiol. Biochem. 20, 13-29.
- Ooshiro, Z. 1971. Studies of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 37, 145-148.
- Oozeki, Y. y M. Baley. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. Mar. Biol. 122, 177-186.
- Ortiz-Galindo, J.L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 64 pp.
- Osorio-Galindo, M. 1998. Efecto de la temperatura y la salinidad en parámetros poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson (Crustacea: Copepoda: Calanoidea) en condiciones controladas. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 68 pp.
- Outzen, H., G.I. Berglund, A.O. Smålås y N.P. Willassen. 1996. Temperature and pH sensitivity of trypsin from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin. Comp. Biochem. Physiol. 115B, 33-45.
- Ozkizilcik, S. y F.L.E. Chu. 1996. Preparation and characterization of a complete microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae. J. Microencapsulation, 13, 331-43.
- Ozkizilcik, S., F.-L.E. Chu y A.R. Place. 1996. Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in Striped bass (*Morone saxatilis*). Comp. Biochem. Physiol. 113B, 631-637.
- Paech, C., T. Christianson y K. Maurer. 1993. Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis. Analyt. Biochem. 208, 249-256.
- Patton, J.S., J.C. Nevenzel y A.A. Benson. 1975. Specificity of digestive lipases in hydrolysis of wax esters and triglycerides studied in anchovy and other selected fish. Lipids 10, 575-583.
- Payán-Aguirre, J.C. 1994. Aspectos biológico-poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Copepoda: Calanoidea) para su utilización en acuicultura. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 63 pp.
- Pedersen, B. y B.O. Eggum. 1983. Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. J. Anim. Physiol. 49, 265-277.
- Pedersen, B.H., E.M. Nilssen y K. Hjelmeland, 1987. Variation in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring *Clupea harengus* digesting copepod nauplii. Mar. Biol. 94, 171-181.
- Pedersen, B.H. y K. Hjelmeland. 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring *Clupea harengus* following digestion of copepods. Mar. Biol. 97, 467-476.

- Pedersen, B.H. y K.P. Andersen. 1992. Induction of trypsinogen in herring larvae (*Clupea harengus*). Mar. Biol. 112, 559-56 Pedersen et al. (19875).
- Pedersen, B.H., B. Uberchär y T. Kurokawa. 2003. Digestive response and rates of growth in pre-leptocephalus larvae of the Japanese eel *Anguilla japonica* reared on artificial diets. Aquaculture 215, 321-338.
- Peña-Martínez, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. y Ortiz-Galindo, J.L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Aquaculture 219,633–644.
- Péres, A., C.L. Cahu, J.L. Zambonino-Infante, M.M. Legall y P. Quazuguel. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 15, 237-242.
- Péres, A., J.L. Zambonino-Infante y C.L. Cahu. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Fish Physiol. Biochem. 19, 145-152.
- Pérez-Borla, O., C.B. Martone y J.J. Sánchez. 1998. Protease I Inhibitor System in Fish Muscle: A Comparative Study. Comp. Biochem. Physiol. 119B, 101-105.
- Person-Le Ruyet, J., B. Menu, M. Cadena-Roa y R. Métailler. 1983. Use of expanded pellets supplementes with attractive chemical substances for the wening of turbot (*Scophthalmus maximus*). J. World Maricul. Soc. 14, 676-678.
- Peyronel, D.V. y A.M. Cantera. 1995. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. Electrophoresis 16, 1894-1897.
- Pigott, G.M. 1982. Enzyme modifications of fishery by product, in chemistry and biochemistry of marine food products. AVI Publishing Company, Westport, C.T., E.U.A.
- Pyeun, J.H. y H.R. Kim. 1986. The proteinase distribuyes in the intestinal organis of fish. Bull. Korean. Fish. Soc. 19, 537-546.
- Raa, J. 1990. Biotechnology in aquaculture and fish processing industry: A success story in Norway. pp. 509–524. En: M.N. Voig y J.R. Botta (Eds.). Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu. y M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture 170, 465-473.
- Richards, W.J. y G.R. Dove. 1971. Internal development of young tunas of the genera *Katsuwonus*, *Euthynnus*, *Auxis*, and *Thunnus* (Pisces: Scomberidae). Copeia 1911, 72-78.
- Riche, M y P.B. Brown. 1992. Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 142, 269-282.
- Robyt, J. F. y W.J. Whelan. 1968. Starch and its Derivates. Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London.
- Rodehutscord, M., S. Mandel, M. Pack, S. Jacobs y E. Pfeffer. 1995. Free amino acids can replace protein-bound amino acids in test diets for studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Nutr. 125, 956-963.
- Rodríguez, C., J.A. Pérez, P. Badía, M.S. Izquierdo, H. Fernández-Palacios, A. Lorenzo-Hernández. 1998. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae when using an appropriate DHA / EPA ratio in the diet. Aquaculture 169, 9-23.
- Roldán-Libenson, G., E. Molina-Camacho, C. Cáceres-Martínez y R. Civera-Cerecedo. 1999. Uso del aceite de langostilla como enriquecedor de rotíferos. Efectos sobre el crecimiento y la sobrevivencia de larvas de cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*). Hidrobiológica 9,77-82.

- Rønnestad, I., Fyhn, H.J., Gravningen, K., 1992. The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). Mar. Biol. 114, 517-525.
- Rønnestad, I., E.P. Groot y Fyhn, H.J. 1993. Compartmental distribution of free amino acids and protein in developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hipoglossus hippoglossus*). Mar. Biol. 116, 349-354.
- Rønnestad, I., Koven, W.M., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1994. Energy metabolism during development of eggas and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Mar. Biol. 120, 187-196.
- Rønnestad, I., A. Thorsen y R.N. Finn. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. Aquaculture 177, 201-216.
- 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 201, 161-175.
- Rosales-Velázquez, M.O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 62 pp.
- Rosenlund, G., J. Stoss y C. Talbot. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diet. Aquaculture 155, 183-191
- Rüdiger, J. D. Kalicharan, K.-J. Halbhuber y J.J. van Der Want. 1998. Extralysosomal localisation of acid phosphatase in rat kidney. Histochem. Cell. Bio. 109, 375-382.
- Rueda-Jasso, R.A. 1993. Efecto del alimento en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) en un sistema semicontinuo. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 81 pp.
- Sabapathy, U. y L.H. Teo. 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. J. Fish Biol. 42, 595-602.
- Salhi, M., M.S. Izquierdo, C.M. Hernández-Cruz, J. Socorro y H. Fernández-Palacios. 1997. The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and changes in liver structure in larval gilthead seabream fed on microdiets. J. Fish Biol. 51, 869-879.
- Salvensen, G. y H. Nagase. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. pp. 83-104. En: R. Beynon and J.S. Bond (Eds.). Proteolytic enzymes. IRL Press Oxford. UK.
- Samuelsen ,T., M. Isaksen y E. McLean. 2001. Influence of dietary recombinant microbial lipase on performance and quality characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 194, 161-171.
- Sánchez-Chiang, L. y O. Ponce. 1981. Gastricsinogens and gastricins from *Merluccius gayi*. Comp. Biochem. Physiol. 68B, 251-257.
- Sander, T.G. y W.J. Rutter. 1972. Molecular properties of rat amylase. Biochem. 11, 131-136.
- Sarasquete, M.C., A. Polo y M.L. González de Canales. 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of *Sparus aurata* L. Histochem. J. 24, 337-344.
- Sarbahi, D.S. 1951. Studies of the digestive tracs and the digestive enzymes of the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 100, 244-257.
- Sargent, J.R., R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1989. The lipids. pp. 154-209. En: Halver, J E., (Ed.). Fish Nutrition. Academic Press. San Diego.
- Sargent, J.R. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. pp. 153-217. En: Bromage, N. R. y Roberts, R. J., (Eds.). Broodstock management and egg and larval quality. Oxford: Blackwell.
- Satterlee, L.D., H.F. Marshall y J.M. Tennyson. 1979. Measuring protein quality. J.A.O.C.S., 56, 103-109.

- Saunders, R.M., M.A. Conner, A.N. Booth, E.M. Bickoff y G.O. Kohler. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods. J. Nutr. 103, 530-535.
- Savoie, L. y S.F. Gauthier. 1986. Dialysis cell for the in vitro measurement of protein digestibility. J. Food Sci. 51, 494-498.
- Sealey, W.M., C. Lim, y P.H. Klesius. 1997. Influence of dietary level of iron from methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. J. World Aqua. Soc. 28, 142-149.
- Segner, H., R. Rosch, H. Schmidht y K.J. Von Poeppinghausen. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. J. Fish Biol. 35, 249-263.
- Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas y W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Biol. 119, 471-486.
- Sheffner, A.L., G.A. Eckfeldt y H. Spector. 1956. The pepsin-digestive residue (PDR) amino acid index of protein utilization. J. Nutr. 60, 105-120.
- Shiau, S. y H. Liang. 1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. J. Nutr. 125, 976-982.
- Shin, D.H. y R.R. Zall. 1986. Purification and identification of trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod. Process Biochem. 21, 11-15.
- Sidell, B.D. y J.R. Hazel. 2002. Triacylglycerol lipase activities in tissues of Antarctic fishes. Polar Biol. 517-522.
- Singleton, R. y R.E. Amelunxen. 1973. Protein from thermophilic microorganisms. Bacteriol. Rev. 37, 320-342.
- Sire, M.F., P.J. Babin y J.M. Vernier. 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. J. Exp. Zool. 269, 69-83.
- Smith, T.K., M. Tapia-Salazar, L.E. Cruz-Suarez y D. Ricque-Marie. 2000. Feed-borne biogenic amines: natural toxicants or growth promoters?. pp. 24-32. En: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán., Mexico.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. pp. 25-46. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Ž. Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). The brine shrimp *Artemia*. Ecology, culturing and use in aquaculture, vol. 3. Universal Press, Wetteren.
- Sorgeloos, P., P. Dhert y P. Candreva. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquaculture 200, 147-159.
- Sosa-Gómez, A. 2002. Evaluación nutricional de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como ingrediente en dietas con diferentes niveles de proteína para *Litopenaeus vannamei*. Maestría en Ciencias del Programa de Posgrado Regional en Acuicultura. Universidad de Sonora. 53 pp.
- Srivastava, A.S., T. Kurokawa y T. Suzuki. 2002. mRNA expresión of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Comp. Biochem. Physiol. 132B, 629-635.
- Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York. 552 pp.
- Steffens, W. 1989. Principles of fish nutrition, Ellis Horwood, London. 384 pp.

- Stepien, C.A, R.H. Rosenblatt, y B.A. Bargmeyer. 2000. Phylogeography of the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*: divergence of Gulf of California and pacific coast populations. *Evolution* 55, 1852–1862.
- Stoknes, I. y T. Rustad, 1995. Purification and characterization of a multicatalytic proteinase from Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B, 587-596.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa. 309 pp.
- Stroband, H.W.J. y K.R. Dabrowski. 1981. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. pp. 355-374. En: M. Fontaine, (Ed.). *Nutrition des Poissons*. C.N.R.S. Paris.
- Stroud, R. 1975. A family of proteins-cutting proteins. *Sci. Am.* 231, 74-89.
- Szlaminska, M., 1980. A histochemical study of digestive enzymes in pike larvae. *Fish. Manage.* 11, 135-140.
- Swaigood, T.D. y L.G. Catignami. 1991. Protein digestibility: in vitro methods of assessment. *Adv. Food Nutr. Res.* 35, 185-235.
- Tacon, A.G.J. 1993. Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. *FAO Fisheries Circular*, 845, 64 pp.
- Tacon, A.G.J. 1995. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 205-214.
- Tacon, A.G.J. y I.P. Foster. 2000. Trenes and challenges to aquaculture and aquafeed development in the new millenium pp. 1-12. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Tacon, A.G.J. y U.C. Barg. 1998. Major challenges to feed development for marine and diadromus finfish and crustacean species. pp. 171-207. En: S.S. de Silva (Ed.). *Tropical mariculture*. Academia Press. New York. U.S.A.
- Takii K, S. Shimeno y M. Takeda. 1985. Changes in digestive enzyme activities in eel after feeding. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 2027–2031.
- Tanaka, M. 1969a. Studies on the structure and functions of the digestive systems in teleost larvae - I. Development of the digestive system during prelarvae stages. *Jpn. J. Ichthyol.* 16, 1-9.
- Tanaka, M. 1969b. Stuilies on the structure and functions of the digestive systems in teleost larvae - II. Characteristic of the digestive system in larvae at the stage of first feeding. *Jpn. J. Ichthyol.* 16, 41-49.
- Tanaka, M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae - III. Development of the digestive system during post larval stage. *Jpn. J. Ichthyol.* 18, 164-174.
- Tanaka, M., S. Kawai y S. Yamamoto. 1972. On the development of the system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juvenil stage in ayu. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 38, 1143-1152.
- Tandler, A., A. Kanazawa y M. Sakamoto. 1982. Effect of food attractants on appetite and growth rate of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Biol.* 20, 673-681.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, T. Caceci. S.A. Smith. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., *Aquaculture* 182, 317–327.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, S.A. Smith y U. Chatreewongsin. 2002. Ontogenic development of intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211, 241-251.

- Theilacker, G.H. 1978. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus* larvae. U.S. Fish. Bull. 76, 403-414.
- Tocher, D.R. y J.R. Sargent. 1984. Studies on triacylglycerol, wax esters and sterol ester hydrolases in intestinal caeca of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets rich in triacylglycerols and wax esters. Comp. Biochem. Physiol. 77B, 561-571.
- Tocher, D.R., G. Mourente y J.R. Sargent. 1997. The use of silages prepared for fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. Aquaculture 148, 213-231.
- Tonheim, S.K., W. Koven y I. Rønnestad. 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. Aquaculture 190, 223-235.
- Torrissen, K.R. 1984. Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 77B, 669-674.
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu, F.J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. pp. 33-46. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera- Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu, F.J., Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture, 204, 113-123.
- Tucker, J.W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A. 750 pp.
- Ueberschär, B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III. pp. 233-239. En: Walther, B.T. y Fyhn, H.J. (Eds.). Physiological and biochemical aspects of fish development. Univ. of Bergen, Norway.
- Umeda, S. y A. Ochiai. 1973. On the development of the structure and function of the alimentary tract of the yellowtail from the larval to the juvenile stage. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 39, 923-930.
- Van Damme, P., G. Janssen y F. Ollevier. 1989. Proteolytic enzymes in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) larvae fed with dry diets. Eur. Aquac. Soc. Esp. Public., 10, 255-256.
- van Tilbeurgh, H., S. Bezzine, C. Cambillau, R. Verger y F. Carrière. 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. Biochim. Biophys. Acta 1441, 173-184.
- Verreth, J. y M. Van Tongeren. 1989. Weaning time in *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. Aquaculture 83, 81-88.
- Versichelle, D., P. Léger, P. Lavens y P. Sorgeloos 1989. L'utilisation d'artémia. pp. 241-259. En: G. Barnabé. (Ed.). Aquaculture. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- Versaw, W., S.L. Cuppett, D.D. Winters y L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. J. Food Sci. 54, 232-254.
- Vu, T.T. 1976. Étude du développement du tube digestif des larves de bar *Dicentrarchus labrax* (L.). Arch. Zool. Exp. Gen. 117, 493-509.
- Vu, T.T. 1983. Etude histoenzymologique des activités protéasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, *Dicentrarchus labrax* (L.). Aquaculture 32, 57-69.
- Waldford, 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. pp 270-277. En: H.J. Bergmeyer (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis. Vol. V, Verlag Chemie. Weinham.
- Watanabe, T. 1981. Ingestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or juveniles of some teleosts. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 57, 1299-1307,
- Watanabe, T., C. Kitajima y S. Fujita. 1983. Nutritional value of live organism used in Japan for mass propagation of fish: A review. Aquaculture 34, 115-143.
- Watanabe, T. y N. Sawada. 1985. Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby *Chaenogobius annularis*. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 37, 1-10.
- Watanabe, T., M.S. Izquierdo, T. Takeuchi, S. Satoh y C. Kitajima., 1989a. Comparison between eicosapentanoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 55, 1635-1640.
- Watanabe, T., T. Takeuchi, T. Arakawa y C. Kitajima. 1989b. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 55, 859-867.
- Watanabe, T. y V. Kiron. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124, 223-251.
- Weber, K. y M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- Wedermyer, K. 1899. Zur methode der kunstlinchen verdauung stickstoffhaltiger futterbestandteile. Landwirtschaftlichen Versuchsstationen, 51, 375-385.
- Weirich, C.R. y R.C. Reigh. 2001. Dietary lipids and stress tolerance of larval fish. pp.189-198. En: Lim C. y Webster C.D. (Eds.), Nutrition and fish health. FP Publishers. USA.
- Weltzien, F.-A., M. Planas, I. Cunha, M.S. Vejen y H.F. Fyhn. 1999. Free amino acid and protein content of Start-feeding larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*) at three temperatures. Biol. Mar. 133, 327-336.
- Whitaker, J.R. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2^a ed., Marcel Dekker, INC, New York. 789 pp.
- Wormhoudt, A., G. Bourreau y G. Le Moullac. 1995. amylase polymorphism in crustacea Decapoda: Electrophoretic and Immunological studies. Biochem. Syst. Ecol. 23, 139-149.
- Yamada, A., K. Takano y I. Kamoi. 1993. Purification and properties of protease from tilapia stomach. Nippon Suisan Gakkaishi. 59, 1903-1908
- Yamamoto, T.S. y W. Kobayashi. 1992. Closure of micropyle during embryonic development of some pelagic fish eggs. J. Fish Biol. 40, 225-241.
- Yoshinaka, R., M. Sato, T. Suzuki y S. Ikeda. 1984. Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish (*Parasilurus asotus*). Comp. Biochem. Physiol. 77B, 1-6.
- Yúfera, M., E. Pascual, A. Polo y M.C. Sarasquete. 1993. Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae at first feeding. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 169, 259-272.
- Yuferá, M., M.C. Sarasquete y C. Fernandez-Díaz. 1996. Testing proteinwalled microcapsules for the rearing of first- feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. Mar. Freshwater Res. 47, 211-216.
- Yúfera, M., E. Pascual, C.A. Fernández-Díaz. 1999. Highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. Aquaculture 177, 249-256.
- Zaldivar-Larain, F.J. 2002. Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuicícola. pp. 516-526. En: Cruz-Suárez L.E., Rique Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds.), VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicícola, 3 al 6 de Septiembre de 2002, Cancún, Quintana Roo, México.

- Zambonino-Infante J.L. y C.L. Cahu. 1994a. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish. Physiol. Biochem. 12, 399-408.
- Zambonino Infante, J.L. y C.L. Cahu. 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comp. Biochem. Physiol. 109A, 209-212.
- Zambonino-Infante, J.L., C. Cahu, A. Péres, P. Quazuguel y M.M. Le Gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. Aquaculture 139, 129-138.
- Zambonino-Infante, J.L., C.L. Cahu y A. Peres. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 127, 608-614.
- Zambonino-Infante, J.L. y C. Cahu. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 129, 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. 130C, 477-487.

11. ANEXO

Tabla 1. Composición de aminoácidos (en mg/100 mg de materia seca) de juveniles de cabrilla arenera y de algunos de los ingredientes utilizados para la formulación y fabricación de las dietas microparticuladas.

Aminoácido	Juvenil de cabrilla	Hidrolizado de pescado	Harina de calamar	Harina de sangre	Harina de trigo	Harina de sardina
ASP	6.82	3.31	7.03	7.54	5.28	4.82
GLU	10.56	5.65	10.96	7.90	27.25	9.84
SER	5.36	4.20	7.58	6.61	3.94	4.99
GLI	14.70	19.26	13.85	11.16	7.72	16.88
HIS	1.95	2.15	0.89	4.60	1.27	2.21
ARG	nd	3.07	7.03	6.34	2.01	8.03
TRE	6.98	4.95	7.37	8.48	7.70	8.50
ALA	9.19	5.52	nd	10.12	21.42	nd
PRO	1.16	18.64	13.32	nd	nd	10.50
TIR	0.27	2.64	2.43	3.00	0.64	2.21
VAL	0.82	6.39	8.76	9.17	0.69	8.73
MET	3.72	nd	nd	nd	4.92	nd
CIS	8.40	6.90	8.58	8.26	7.21	9.86
ILE	3.57	4.62	3.63	5.53	3.04	3.42
LEU	7.29	nd	5.32	4.20	3.69	6.61
FEN	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TRP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
LIS	0.15	0.31	0.04	0.23	0.31	0.08

ASP-Ácido aspártico; GLU-Ácido glutámico; SER-Serina; GLI-Glicina; HIS-Histidina; ARG-Arginina; TRE-Treonina; ALA-Alanina; PRO-Prolina; TIR-Tirosina; VAL-Valina; MET-Metionina; CIS-Cisteina; ILE-Isoleucina; LEU-Leucina; FEN-Fenilalanina; TRP-Triptofano; LIS-Lisina. nd: no detectado.

PRODUCTOS.

Hasta el momento, de esta tesis se han generado los siguientes productos terminados:

Alvarez- González, C.A., H. Nolasco-Soria, R. Civera-Cerecedo, S. Dumas, J.L. Ortiz-Galindo and M.O. Rosales-Velázquez. 2001. Development of some digestive enzymes in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. pp. 44-47. In Lavi 2001 3rd Fish and Shellfish Larviculture Symposium, Gent, Belgium, sept. 3-6. C.I. Hendry, G. van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos. European Aquaculture Society, No. 30.

Civera-Cerecedo, R., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, H. Nolasco-Soria, C.A. Alvarez-González, B. Anguas-Vélez, R. Peña-Martínez, M. Rosales-Velázquez, V. Carrasco-Chávez, R. García-Gómez y E. Goytortúa. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. 2002. pp. 352-406. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. VI Symposium Internacional DE Nutrición Acuicola, 3 al 6 de septiembre. Cancún, Quintana Roo, México. ISBN 970-694090-1.

Actualmente, se están preparando los siguientes manuscritos, los cuales serán sometidos en revistas internacionales con arbitraje.

Digestive enzyme development of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Se someterá en la revista Aquaculture.

Ontogeny of nonspecific esterases in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Se someterá en la revista Fish Physiology and Biochemistry.

Characterization and functional properties of digestive proteases in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* juveniles. Se someterá en la revista Comparative Biochemistry and Physiology.

Study of *in vitro* digestibility capacity of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* with different animal protein sources. Se someterá en la revista Fish Physiology and Biochemistry.

Effect of microparticulated diets on growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae at two early weaning times. Se someterá en la revista Aquaculture Nutrition.