



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE JUVENILES DE PEZ BLANCO  
(*Menidia estor*) ALIMENTADOS CON DIETAS A BASE DE PROTEÍNA  
HIDROLIZADA DE BAGRE ARMADO (*Pterygoplichthys  
disjunctivus*).**

**TESIS**

Que Presenta

**BIOL. ANA MAURICIA AVALOS SÁNCHEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Directora de Tesis**

**DRA. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS**

**Codirector de Tesis**

**DR. CARLOS A. MARTÍNEZ PALACIOS**

**Morelia, Michoacán, Abril 2010**

## DEDICATORIA

*A mi madre, por darme lo fundamental, lo que se necesita en la vida para salir adelante: su amor, cariño, confianza y apoyo incondicional. Gracias mamá por los valores inculcados, por tu ejemplo de lucha y por tus oraciones. Siempre estás en mi corazón.*

*Ambas sabemos lo que significa el logro de una meta más...*

*A mis herman@s con quienes he compartido una hermosa familia: Arminda, Miguel, Adrián, Isabel, Bertha y Malena, gracias por su amor y apoyo.*

*A mis sobrín@s: Luis, Tzitzí, Betsy, Karla, Sara, Toño... y especialmente a los angelitos más pequeños: Ana Isabel, Valentina, Leo, y Said, por ser todos ustedes motivo de orgullo y alegría para la familia y para mi corazón.*

*A César A. por todo su amor, paciencia y apoyo incondicional.*

*Gracias a todos... pues el saber que ustedes estaban ahí me ha dado fuerza y aliento en todas las situaciones*

## AGRADECIMIENTOS

Estas líneas de agradecimiento van dedicadas para todas aquellas personas con quienes, tanto en el ámbito personal como profesional, tuve la suerte de contar durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco profundamente a mi asesora, la **Dra. Mayra Toledo Cuevas**, por su invaluable compromiso como guía y tutora, por todo su tiempo y apoyo en la minuciosa y paciente labor de revisión de esta tesis. Más allá de lo que significa este trabajo, gracias por tu confianza, por permitirme entrar a tu hogar y formar casi parte de tu familia, gracias por tu amistad y extraordinaria calidad humana. Gracias también a dos más de mis angelitos, Sofi y Artur, por su gran aprecio y cariño.

Un agradecimiento especial al **Dr. Carlos Martínez Palacios** quien fungió como codirector de este trabajo, por haberme permitido formar parte del grupo de trabajo que exitosamente lidera, por su confianza, apoyo y valiosos consejos que ayudaron a llevar a buen término este proyecto.

Un reconocimiento y agradecimiento especial al **Dr. Héctor Nolasco Soria**, por el gran apoyo brindado y su valioso tiempo invertido en la enseñanza de técnicas de laboratorio, así como en la eficiente e importante revisión del trabajo de tesis y sus valiosos comentarios y aportaciones al mismo.

A los doctores: **Patricia Ríos Chávez** y **Juan Pablo Lazo Corvera**, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios.

A la Dra. Ma. Gisela Ríos por su valiosa ayuda y consejos durante el desarrollo de este trabajo, además de su amistad.

A los doctores Juan José Alarcón, Víctor Baizabal, Mauro Martínez Pacheco, Alejandro Bravo y Raúl Cárdenas, por las facilidades otorgadas para hacer uso de sus laboratorios y equipos y por su ayuda en la resolución de ciertas dudas.

A los amigos y/o compañeros del laboratorio de Nutrición y Acuicultura IIAF-UMSNH: Lazaro, Chucho, Toño Tello, Dafne, Liz, Toño Campos, Jorge, Adriana, Mari Carmen, Ana Carmen, Gloria, Cristian, David, Willi, Mariela, Pamela y Toña, quienes de alguna manera formaron parte importante de esta etapa, por su amistad y apoyo y por los agradables momentos de esparcimiento.

Especialmente gracias a Lidia, por su gran calidad humana y por estar siempre dispuesta a escuchar y brindar palabras de aliento en los momentos difíciles, gracias por tus excelentes consejos.

A mis grandes amig@s de siempre, porque aunque pasa el tiempo y la vida nos lleva por distintos caminos, sé dónde encontrarlos. Gracias a todos por su apoyo y por la dicha de contar con su amistad: Ana Rosa, Rosy, Luisa, Juan Manuel, Rita, Magda, Haydee, Laura, Jacqueline, Alma, Gladis, Luis E, Alex e Ismael.

Agradezco al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la UMSNH por darme oportunidad y espacio para mi formación en estudios de posgrado.

Igualmente a Lili la secretaria del posgrado por su siempre amable atención ayuda en la resolución de dudas y proceso de trámites.

**Agradezco ampliamente el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos:**

Programa de becas nacionales para estudios de posgrado CONACYT.

Proyecto Fondo SEP-CONACyT No. 83920 “Estudios sobre la fisiología digestiva de peces blancos (*Menidia estor* y *Menidia promelas*) y pejerreyes (*Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*) para optimizar su crecimiento”.

Proyecto Fondo Mixto CONACyT- Gobierno del Estado de Michoacán No. 53437 “Estudio prospectivo del estado ecológico y productivo del embalse López Mateos; una propuesta para un adecuado manejo biológico, pesquero y de acuicultura”.

Proyecto COECyT 2009 “Investigación Aplicada a Sectores Estratégicos para el Desarrollo”

**Agradezco el apoyo con infraestructura y equipo de los siguientes laboratorios y de sus técnicos:**

Laboratorio de Nutrición y Acuicultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH, y su técnico M.C. Lidia Ambríz Cervantes.

Laboratorio de Fisiología Comparada del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR-La Paz B.C.), y a su técnico Patricia Hinojosa Baltazar.

Laboratorio de Nutrición Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH, y a su técnico M.C. Nayda Luz Bravo Hernández.

Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH, y a su técnico Alberto Flores.

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología CMEB-UMSNH.

**Agradezco el apoyo con la donación de materias primas a:**

Novozymes de Latinoamérica, por la donación de enzimas proteolíticas.

Dr. Francisco Negrete, DSM Nutritional Products, México. Por la donación de vitaminas y minerales.

Dra. Ruth Pedroza Islas, Universidad Iberoamericana, México. Por la donación de proteínas.

**Gracias a toda mi familia por creer en mí y apoyarme y a Dios por prestarme vida y fortaleza para llegar a este momento.**

## CONTENIDO

	Página
<b>Dedicatoria</b>	i
<b>Agradecimientos</b>	ii
<b>I. Resumen general</b>	1
<b>II. Summary</b>	3
<b>III. Introducción general</b>	4
<b>IV. Hipótesis</b>	12
<b>V. Objetivos</b>	13
<b>VI. Resultados</b>	14
<i>Resumen</i>	14
<i>Abstract</i>	15
<i>Introducción</i>	16
<i>Materiales y Métodos</i>	18
Preparación de hidrolizados enzimáticos de proteína muscular de bagre armado (ensayos preliminares)	18
Determinación del peso molecular de los péptidos obtenidos en los hidrolizados, empleando como referencia hidrolizados comerciales de soya y pescado	19
a) Mediante cromatografía de filtración en gel	19

b) Mediante cromatografía en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	19
Elaboración de hidrolizados de bagre armado para su inclusión en las dietas experimentales	20
Liofilización de hidrolizados	20
Análisis proximales	20
Formulación de dietas	21
Elaboración de dietas experimentales	23
Sistema experimental	24
Calidad del agua	25
Análisis Estadísticos	25
 <b><i>Resultados y Discusión</i></b>	 26
Perfil peptídico de los hidrolizados	26
Crecimiento de juveniles de pez blanco alimentados con dietas a base de hidrolizados proteínicos de bagre armado.	28
Calidad del agua	28
Crecimiento	29
Crecimiento y eficiencia alimenticia	34
Supervivencia	36
Composición proximal de los peces	37
<b><i>Conclusiones</i></b>	40
<b><i>Literatura citada</i></b>	41
<b>VII. Perspectivas y recomendaciones</b>	46
<b>VIII. Bibliografía complementaria</b>	47

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, teñidos con azul de Coomasie.	27
<b>Figura 2.</b> Crecimiento de juveniles de <i>M estor</i> , alimentados durante 60 días con las distintas dietas experimentales.	30
<b>Figura 3.</b> Ganancia de peso individual de juveniles de <i>M estor</i> , alimentados durante 60 días con las distintas dietas experimentales.	30
<b>Figura 4.</b> Supervivencia de juveniles de <i>M. estor</i> , alimentados durante 60 días con los diferentes tratamientos.	36

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición proximal de los materiales utilizados como fuente de proteína en la preparación de las dietas experimentales.	21
<b>Cuadro 2.</b> Formulación de las dietas experimentales con la inclusión de los hidrolizados (liofilizados) de bagre armado de diferentes tiempos de digestión.	22
<b>Cuadro 3.</b> Análisis bromatológico de las dietas experimentales.	24
<b>Cuadro 4.</b> Parámetros fisicoquímicos de calidad del agua.	28
<b>Cuadro 5.</b> Crecimiento y eficiencia alimenticia.	34
<b>Cuadro 6.</b> Composición proximal de juveniles alimentados con las dietas experimentales.	37



## I. RESUMEN GENERAL.

El pez blanco *Menidia estor* (Jordan 1879) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, es una especie nativa y endémica del altiplano mexicano, perteneciente a la familia Atherinopsidae. Por su valor económico, cultural y nutricional es la especie de mayor importancia en la región, que por muchos años ha sido la base de la subsistencia del pueblo Purépecha. Debido a la intensa explotación y deterioro de su hábitat se le considera como una especie amenazada (Marez y Morales 2003), razón por la cual se vuelve necesaria la implementación de su cultivo. Durante los últimos diez años se han llevado a cabo esfuerzos de investigación (Martínez-Palacios *et al.* 2002, 2008) destinados a lograrlo exitosamente, obteniendo avances importantes. Sin embargo, una de las principales limitantes es su bajo desempeño en cuanto a crecimiento y supervivencia asociado a la utilización de dietas balanceadas. Diversas investigaciones han demostrado que los estudios sobre fisiología digestiva de las especies, contribuyen a generar dietas más adecuadas.

Los estudios realizados sobre anatomía y bioquímica digestiva en el pez blanco (Toledo-Cuevas *et al.* 2007, Martínez-Palacios *et al.* 2008) sugieren una mayor importancia de la digestión citosólica sobre la luminal. Con base en esto, parece ser recomendable ofrecer un alimento que contenga péptidos pequeños y aminoácidos libres disponibles para su más fácil digestión y absorción. Una alternativa a esto es la inclusión de hidrolizados proteínicos. En este trabajo se utilizó como fuente proteínica al bagre armado *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber 1981 o pez diablo, proveniente de la región del bajo Balsas en Michoacán. Esta es una especie pesquera sin actual valor comercial a la que se pretende encontrar alguna utilidad, tanto como alimento para consumo humano como animal, dada su abundancia y alta calidad nutricional.

Se llevó a cabo un experimento para evaluar el crecimiento y la supervivencia de juveniles de pez blanco, alimentados con cuatro dietas isoproteínicas e isocalóricas, a base de proteína hidrolizada de bagre armado, y una testigo conteniendo proteína hidrolizada comercial de pescado. Los hidrolizados de bagre armado fueron a diferentes tiempos de digestión: 0, 15, 60 y 240 minutos, con el empleo de la enzima Protamex®, una proteasa comercial grado alimenticio.

Los juveniles de pez blanco, con peso promedio inicial de 421.67 mg, fueron alimentados durante 8 semanas. Los grupos experimentales alimentados con dietas con bagre armado sin hidrolizar (NOH), con 15 min (H15MIN) y 60 min (H60MIN) de digestión, mostraron mejor crecimiento que los alimentados con el hidrolizado de 240 min (H240MIN) y la dieta testigo, sin bagre armado. En los cinco tratamientos se obtuvo una supervivencia mayor al 70%.

La inclusión de bagre armado en dietas para pez blanco, favorece de manera muy importante su crecimiento (229% de peso ganado en 2 meses) y supervivencia (superior al 70%). Este resultado se obtuvo incluso sin la necesidad del proceso de hidrólisis. De esta manera se disminuye el costo de producción de alimentos para esta especie, al utilizar un recurso pesquero abundante y de bajo costo en la región.

## II. SUMMARY.

The Mexican silverside *Menidia estor* (Jordan 1879) from Lake Pátzcuaro Michoacán is a native and endemic species of the Mexican plateau, family Atherinopsidae. Is the most important species in the region for its economic, cultural and nutritional value, which has been for many years the basis of the subsistence of the Purépecha Indian people. Due to the intense exploitation and degradation of its habitat, is regarded as endangered species (Marez y Morales 2003), therefore becomes a need its culture implement. In the last ten years have conducted research (Martínez-Palacios *et al.* 2002, 2008) efforts for a successfull culture, with significant progress. But there are still some limitations of growth and survival with artificial balanced diets.

Studies on the anatomy and digestive biochemistry (Toledo-Cuevas *et al.* 2007, Martínez-Palacios *et al.* 2008), indicate early digestive maturation and greater importance of cytosolic digestion than the luminal. For this, it's advisable to offer easily digestible food containing small peptides and free amino acids available for absorption. An alternative is the inclusion of armoured catfish protein hydrolyzate *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber 1991 or devil fish, from the bajo Balsas in Michoacán region. This is an actual fish species without commercial value at which we find some useful, both as food for human or animal consumption because it's abundant and has high nutritional quality.

In the present study, we evaluate the growth and survival of juvenile *M. estor*, fed with five isocaloric and isoproteinic diets, hydrolyzate protein from the armoured catfish of different times of hydrolysis (0, 15, 60 and 240 min.), using Protamex®, a commercial food-grade protease [0.1%], and a control diet without armoured catfish (containing hydrolyzed commercial protein fish\*). The fish with an average initial weight of 421.67mg were fed for 8 weeks. The experimental groups fed with diets armoured catfish unhydrolysed (NOH), 15 min (H15MIN) and 60 min (H60MIN) showed better growth than those fed hydrolyzed to 240 min (H240MIN) and the control diet. In the five treatments was obtained more than 70% survival.

The inclusion of armoured catfish in diets for white fish, favoring growth (229% of weight gain in 2 months) and survival (higher 70%). This result was obtained even without the need of the hydrolysis process. Thus, it lowers the cost of food production for this species to use a fishery resource abundant and low cost in the region.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL.

La acuicultura es la industria alimenticia de mayor crecimiento a nivel mundial (FAO 2009). Su desarrollo está basado en la diversificación de especies a cultivar. En México se ha basado principalmente en el cultivo de especies exóticas; sin embargo, las especies nativas han cobrado gran importancia por su alto valor económico y aceptación social, adquiriendo por ello un gran potencial para la acuicultura comercial (Dillanes 2001).

En Michoacán, una de las especies de mayor importancia para la acuicultura comercial es sin duda el pez blanco del Lago de Pátzcuaro *Menidia estor* Jordan 1879 (antes *Chirostoma estor*) (Miller *et al.* 2005), pez nativo perteneciente a la familia *Atherinopsidae* (Dyer y Chernoff 1996), la cual está representada por alrededor de 150 especies en su mayoría marinas y estuarinas. El pez blanco es una especie totalmente de agua dulce, aunque posee muchas características en común con los *Atherinopsidos* marinos debido a un ancestro común (Barbour 1973).

Las diferentes especies de *Menidia* tienen una fuerte influencia sobre la cultura, medioambiente y economía de la gente nativa de la región, siendo *M. estor* la especie más emblemática y por tanto, la de mejor cotización en los mercados regionales, alcanzando costos de hasta \$80 USD/kg en época de cuaresma (Martínez-Palacios *et al.* 2008). Debido a esto, ha sido explotada por años, lo cual aunado a problemas de contaminación y deterioro de su hábitat han disminuido sus poblaciones hasta el punto de considerarse actualmente en peligro (Marez y Morales 2003). Como consecuencia, se vuelve una inminente necesidad la implementación de su cultivo, ya que además de representar una opción para su explotación es una fuente generadora de empleos (Campos *et al.* 2009).

A una década de investigaciones en busca del éxito comercial en el cultivo de *M. estor*, se ha logrado completar su ciclo de vida en cautiverio, y tener avances muy importantes en diversas áreas, como conocer sus requerimientos medioambientales (Martínez-Palacios *et al.* 2004), tener un control sobre su ciclo reproductivo (Martínez-Palacios *et al.* 2002), avanzar en el conocimiento de sus hábitos alimenticios y sus requerimientos nutricionales y recientemente sobre su anatomía y bioquímica digestiva (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

### *Avances en la determinación de requerimientos nutricionales para M. estor.*

La proteína es el componente mayoritario y el de mayor importancia en la dieta de peces (García-Carreño *et al.* 2002), ya que es indispensable en la formación del músculo, participa en el crecimiento y mantenimiento y juega un papel importante como fuente de energía (Jobling 1994). Debido a esto, se realizó la determinación del requerimiento de proteína para juveniles, el cual resultó estar entre el 40 y 50% (Martínez-Palacios *et al.* 2007). El requerimiento de proteína en los peces está influenciado por diferentes factores tales como la edad, calidad de los ingredientes de la dieta, la relación proteína energía, tasa alimenticia, etc., lo cual se refleja en el crecimiento (Tacon 1989).

En cuanto al requerimiento de ácidos grasos esenciales (EFA), se logró determinar que el pez blanco tiene la capacidad, como la mayoría de los peces de agua dulce, de sintetizar eficientemente ácidos grasos de cadena larga, a partir de sustratos de 18 carbonos como el ácido linolénico (18:3n-3), pero a diferencia de otros peces, en los que es común encontrar proporciones EPA/DHA de 4:1, 1:2 ó 1:1, el pez blanco cuenta con un perfil EPA/DHA de 1:10 ó 1:20 (Martínez-Palacios *et al.* 2006, 2008). Además, esta capacidad no parece limitarse cuando es cultivado en salinidad (Pineda-Delgado 2010).

En relación al nivel de tolerancia de carbohidratos, se encontró para juveniles el mejor crecimiento y supervivencia utilizando entre el 5 y 15% de almidón crudo (Canseco-Murillo 2008). En general, la capacidad de digestión de carbohidratos por los peces limitada (Spannhof y Plantikow 1983). Los peces de aguas cálidas los utilizan con mayor eficiencia que los de aguas frías y que los marinos (Van Wormhoudt 1980; en Cruz-Suárez *et al.* 2002), y los herbívoros más que los carnívoros. Aunque en peces no se ha establecido un requerimiento de carbohidratos, el incluirlos en la dieta representa una fuente económica de energía, que ahorra proteína (Jobling 1994).

Por otro lado, se determinó que el requerimiento de vitamina C para juveniles de pez blanco es de 255 mg/kg. El estudio se hizo necesario por los diversos signos de deficiencia detectados en los organismos en cultivo; tales como: hemorragias, lordosis, escoliosis, malformaciones óseas, erosión de aletas, exoftalmia, entre otros. En el estudio se encontró que los peces alimentados con niveles bajos de vitamina C presentaron alta mortalidad (Martínez-Palacios *et al.* 2006, Ríos-Durán, 2007).

Con base en estos estudios se han formulado diversas dietas para el pez blanco, incluyendo ingredientes de muy alta calidad (Martínez-Palacios, Com. Per.). No obstante, no se ha logrado aun formular una dieta óptima, que promueva el crecimiento en el menor tiempo y con una alta supervivencia, en comparación con los resultados obtenidos al suministrar alimento vivo.

Este bajo rendimiento con dietas balanceadas se ha encontrado de manera general en larvas de peces marinos, lo que se atribuye por un lado, a la falta de un sistema digestivo plenamente desarrollado y con baja actividad enzimática, por lo que existe una pobre digestión de las dietas y/o éstas no estimulan la secreción de sus enzimas (Cahu y Zambonino 1997, Díaz *et al.* 1997, Lazo *et al.* 2000b). Por otra parte, la complejidad de las dietas suministradas dificulta que los nutrientes se presenten en forma asimilable, aunado a la inclusión, por desconocimiento, de niveles inadecuados de ciertos nutrientes esenciales (Lazo 2000a).

De manera que, para poder desarrollar dietas *ad hoc* para la especie y para sus estadios en particular, resulta importante conocer las características del sistema digestivo y sus cambios estructurales y funcionales relacionados con los procesos enzimáticos y con los mecanismos de absorción de los nutrientes, para poder adecuar la formulación a la capacidad digestiva y lograr la total satisfacción de sus requerimientos nutricionales.

#### ***Avances en Anatomía y Bioquímica digestiva del pez blanco.***

Los estudios en estas áreas han permitido encontrar el pez blanco es una especie con hábitos y características de un carnívoro filtrador (zooplánctófago) posee un complejo sistema de filtración orobranchial y un intestino corto (relación 0.7:1, respecto de la longitud del cuerpo) (Ross *et al.* 2006). Es un pez agástrico y sin ciegos pilóricos, por lo que carece de digestión ácida, de forma tal que el pH en todo su tracto digestivo se encuentra entre 6.5 y 8. Todas estas características son indicativas de un comedor continuo, que debe tener acceso a presas abundantes y altamente digeribles (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

En cuanto a bioquímica digestiva, los estudios sugieren una maduración digestiva temprana (Martínez-Palacios *et al.* 2008), ya que se ha detectado actividad enzimática digestiva de las principales enzimas pancreáticas e intestinales desde el momento de la eclosión. Se detectaron niveles importantes de las proteasas tripsina y quimotripsina, principalmente de ésta última. Esto podría compensar la ausencia de pepsina y su carencia de estómago, ya que ambas tienen

los mismos sitios de hidrólisis. Según Cahu y Zambonino (2001), la falta de estómago no dificulta la digestión enzimática de proteínas en larvas de peces, pues ésta se asegura por las enzimas pancreáticas e intestinales.

En este sentido, es relevante mencionar que una de las características más representativas de maduración digestiva es la disminución de las enzimas citosólicas (leucin alanin peptidasa, fosfatasa ácida) y el aumento de las de membrana (fosfatasa alcalina, leucin aminopeptidasa) (Cahu y Zambonino 2001). No obstante, ésta disminución no solo no se detectó en el pez blanco, sino que los niveles de las enzimas citosólicas resultaron mucho más elevados en juveniles de 90 días (Toledo-Cuevas *et al.* 2007). Al parecer los peces, incluso en etapa juvenil, parecen comportarse digestivamente como larvas. Este hallazgo resulta contrario al modelo de maduración para peces con estómago, lo que sugiere que, o bien los peces blancos presentan un modelo de maduración distinto, o este es más tardío.

A pesar de esto, en investigaciones previas sobre digestibilidad *in vitro* de proteína en larvas, juveniles y adultos de pez blanco se pudo constatar que esta especie tiene las enzimas necesarias para digerir dietas inertes, aún cuando contienen los materiales ligantes y/o aglutinantes (como el alginato de sodio, la goma arábiga y la carragenina), que en su mayoría son agentes antinutricionales y poco digestibles (Avalos-Sánchez 2006).

### ***Importancia de la inclusión de aminoácidos, péptidos y proteína soluble en dietas, sobre la función digestiva y crecimiento.***

Tomando en cuenta que muchas especies exhiben un crecimiento exponencial durante la etapa larvaria, se requieren grandes cantidades de amino ácidos para producir las proteínas que van a conformar los tejidos durante el crecimiento y suplir además la energía requerida para el metabolismo (Rønnestad *et al.* 1999). Basados en el hecho de que el zooplancton, del que se alimentan la mayoría de los peces en su ambiente natural, contiene un alto nivel de proteína y de aminoácidos libres, se utilizan en las dietas balanceadas, por lo general, niveles de proteína cruda del 55 al 60%.

Sin embargo, diversos estudios han mostrado que las proteínas no son tan eficientemente absorbidas como los aminoácidos (Rønnestad *et al.* 2000), tanto en peces en diferentes estadios como en otros vertebrados, incluyendo al hombre. Rust (1995), en larvas de varias especies de peces sin estómago, determinó que las larvas absorben y metabolizan más

eficientemente los aminoácidos en forma simple, que los nutrientes complejos, siendo el orden de asimilación como sigue: aminoácidos libres > péptidos > proteínas. Otras investigaciones han revelado la importancia de incluir aminoácidos libres y péptidos pequeños, así como proteínas solubles, en la alimentación de larvas y juveniles de peces (Cahu y Zambonino 2001, Zambonino *et al.* 1997). Una de las ventajas que se obtiene mediante digestión parcial de los nutrientes (en este caso de la proteína), es que éstos se vuelven más digeribles y biodisponibles (Castillo 1990, Clemente 2000).

Fhynn (1989), Rønnestad *et al.* (1992), Rønnestad *et al.* (2003) mencionan que las larvas y juveniles utilizan como fuente de energía para el metabolismo los aminoácidos libres y péptidos, dado que son de fácil digestión y compensan la ausencia de estómago y los bajos niveles de enzimas digestivas. Además algunos aminoácidos desencadenan respuestas de búsqueda (Gly, Ala) e ingesta (Ala, Cys, Ser) de alimento, y también parecen actuar como reguladores y estimulantes de la función y maduración digestiva (Cahu *et al.* 2004, Rønnestad *et al.* 1992, Rojas-García y Rønnestad 2002) ya que pueden tener un efecto potenciador de la liberación de colecistocinina (CCK). La CCK es una hormona producida en el intestino (duodeno) cuya función es estimular la producción de enzimas del páncreas y la liberación de bilis, por la vesícula biliar (Liddle 1995).

Cahu *et al.* (2004), en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), determinaron que la inclusión de bajas concentraciones (14%) de hidrolizado proteínico en las dietas estimulan la expresión y la actividad de tripsina y mejoran el crecimiento. También en larvas de lubina se observó que al sustituir solo parcialmente (20%) la proteína nativa por di y tripéptidos aumentó el crecimiento y la supervivencia (Zambonino *et al.* 1997).

Sin embargo, el efecto positivo de la calidad de la proteína (grado de hidrólisis, niveles de inclusión y solubilidad) en las dietas, sobre la función digestiva y crecimiento es un tanto dependiente de la especie y de su estadio de desarrollo. Rønnestad (2002) observó que en el arenque del Atlántico, en estadios tempranos, las proteínas solubles inducen una mayor producción de CCK y contenido de tripsina que los aminoácidos libres. Contrariamente, en la lubina (*D. labrax*), la secreción de tripsina se estimuló con aminoácidos libres, mientras que el hidrolizado de caseína la redujo.



Carvahlo *et al.* (2004), en la carpa común (*Ciprinus carpio*) durante las primeras etapas de vida, encontraron que la caseína soluble no hidrolizada (25% de la proteína total) promueve el crecimiento y la supervivencia, pero que en forma hidrolizada (25% de la proteína soluble total) los resultados son aun mejores. Sin embargo, altos niveles de proteína hidrolizada tienen efectos negativos.

Hevrøy *et al.* (2005), en juveniles de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), determinaron que la inclusión de niveles medios de proteína hidrolizada de pescado en las dietas (180-240g/kg), produjeron un mejor crecimiento que niveles de inclusión más bajos o más altos.

Por otro lado, Yamamoto *et al.* (2002) describieron que las proteínas solubles (provenientes de larvas de sardina) en dietas para larvas de ayu (*Plecoglossus altivelis*), la especie pesquera de agua dulce más importante en Japón, promovieron el crecimiento, mejoraron la tasa de supervivencia y aumentaron la resistencia al ayuno. Cabe destacar el bajo peso molecular de los componentes solubles (proteínas o péptidos) contenidos en estas dietas.

Tomando en consideración tanto las características digestivas del pez blanco, que pareciera comportarse como un organismo de maduración tardía, tipo larvaria, y los estudios de la importancia de incluir proteínas hidrolizadas en las dietas balanceadas, se llevaron a cabo dos experimentos en el pez blanco: por un lado, Pimentel-Acosta (2009) evaluó el crecimiento de juveniles de 3 meses de edad alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de ensilado ácido de bagre armado (*Pterygoplichthys disjunctivus*). Se encontraron resultados favorables con sustituciones de entre el 10 y 20% (p/p) de ensilado por harina de pescado, aunque el mejor crecimiento se obtuvo en los peces alimentados con la dieta testigo sin ensilado. El ensilado es un procedimiento por el cual las proteínas del organismo son digeridas por sus propias enzimas (Bello 1994). Durante el proceso de ensilaje ácido se pierden algunos aminoácidos esenciales para el crecimiento, como triptófano, la lisina y la cisteína (Aurrekoetxea y Perera 2001, Guadix *et al.* 2000), esto pudo ser una causa de la deficiencia en el crecimiento de los peces alimentados con ensilado.

Por otra parte, también se evaluó el crecimiento en juveniles de 6 meses usando dietas con inclusión de hidrolizados comerciales de soya (SUPRO® 590) y/o pescado (CPSP Special G® Sapropeche), en diferente porcentaje (0 a 45% de inclusión). El mejor resultado de crecimiento se obtuvo con la dieta control (sin inclusión de hidrolizado), y en segundo lugar

con la dieta conteniendo una sustitución del 15% de hidrolizado de soya (Martínez-Palacios, Com. Per.).

***Uso del bagre armado como fuente de proteína hidrolizada en dietas para el pez blanco.***

Dados los resultados poco favorables de las experiencias arriba mencionadas, se resolvió cambiar los recursos proteínicos usados en la elaboración de dietas para el pez blanco. Además de incluir al bagre armado con distintos grados de hidrólisis (tiempos de digestión) enzimática, para evaluar nuevamente el efecto de incluir proteínas predigeridas.

Los hidrolizados de proteína se obtienen mediante tratamientos químicos o enzimáticos que rompen a la proteína, originando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres o productos totalmente solubles con elevado contenido proteínico (Aurrekoetxea y Perera 2001). La hidrólisis enzimática se consigue mediante la acción de enzimas exógenas purificadas con actividad proteolítica. Ésta presenta ventajas frente a los tratamientos químicos (Diniz y Martin 1997) tales como una mayor selectividad de sustratos y la realización de estos procesos en condiciones térmicas menos drásticas y más fácilmente controlables, manteniendo por lo tanto, el valor nutricional del producto (Belen *et al.* 2007). Los hidrolizados de proteínas se emplean a escala comercial en productos hipoalergénicos y en nutrición infantil y clínica, pues mediante hidrólisis enzimática se reduce la antigenicidad de la proteína (Prieto 2007).

Existen referencias de gran variedad de enzimas utilizadas en la obtención de hidrolizados proteínicos a partir de subproductos de la pesca (Diniz y Martin, 1997), como residuos de túnidos (Sampedro *et al.* 1986), sardina (*S. pilchardus*) (Quaglia y Orban 1987), arenque (*Clupea harengus*) (Hoyle y Merritt 1994), dorada y rodaballo (Aurrekoetxea y Perera 2001), entre otros.

En general, para la elaboración de las dietas se deben buscar ingredientes costeables que sustituyan a los de mayor precio y que se encuentren disponibles en la región. Es por ello que en el presente trabajo, se consideró como una buena opción de fuente proteínica el empleo del pez armado sudamericano (*Pterygoplichthys disjunctivus* Weber 1991), en la elaboración de hidrolizados para las dietas de juveniles de pez blanco.

Esta especie, conocida en México como pez diablo, pez armado o bagre armado, fue introducida accidentalmente en varias de las cuencas hidrológicas más grandes del país, incluida la cuenca del Balsas en Michoacán, y dentro de ésta en la presa de Infiernillo, en donde se ha considerado como una amenaza para la productividad de la pesquería tradicional de tilapia, de cuya pesca depende el sustento de cientos de familias en la región (Mendoza *et al.* 2007).

El bagre armado presenta una estructura externa ósea altamente espinosa, que lo hace poco atractivo para su comercialización, situación que limita su aprovechamiento como recurso alimentario. Debido a esto se desechan grandes cantidades de este recurso en las orillas de los cuerpos de agua, generando un problema de contaminación. Por ello es de interés realizar estudios orientados a su posible uso como materia prima para la obtención de productos de mayor valor agregado y utilidad, dada su abundancia y ahora conocida alta calidad nutricional, ya que contiene un porcentaje de proteína mayor al 50% (Martínez-Palacios *et al.* 2009, 2010).

Dentro de las alternativas de aprovechamiento de esta especie se encuentran, lograr su incorporación directa en la alimentación humana y animal. Como alimento para producción animal se buscó su aplicación tanto en la acuicultura, mediante la elaboración de productos industriales y subproductos con valor agregado, como el ensilado e hidrolizado y la harina de pescado (Martínez-Palacios *et al.* 2009), como en la producción de alimentos para el sector ganadero (Martínez-Palacios *et al.* 2009 y 2010).

Con el presente trabajo se pretende entonces abordar dos problemas importantes en el estado de Michoacán; por un lado elaborar una dieta para juveniles de pez blanco, evaluando el efecto de una proteína prehidrolizada (proveniente del pez armado) sobre su crecimiento. Adicionalmente, si ésta resultara exitosa podrían abarataarse los costos de producción al ser el pez armado una fuente económica de proteína. Por otro lado, se estaría proporcionando una aplicación a este abundante recurso pequero, constituyéndose en una posible alternativa de solución al problema ecológico en la cuenca del Balsas.

#### IV. HIPÓTESIS

Dadas las características anatómicas y bioquímicas digestivas particulares de *M. estor*, como son su carencia de estómago e intestino corto y la mayor importancia de la digestión citosólica que de la luminal, es recomendable ofrecerle alimento altamente digestible. Al igual que para otras especies de peces, es posible que la inclusión de proteínas hidrolizadas en las dietas aumente su crecimiento y mejore la supervivencia. De lo anterior se deriva la siguiente hipótesis:

La inclusión de proteínas predigeridas, a nivel de péptidos y aminoácidos libres, producidas por hidrólisis enzimática de proteína muscular de pez armado, en dietas para juveniles de pez blanco, aumentará la biodisponibilidad de la fuente proteínica logrando mejorar el crecimiento y supervivencia de esta especie en cultivo.

## V. OBJETIVOS

### General

- Evaluar el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco (*Menidia estor*) alimentados con dietas a base de proteína hidrolizada de pez armado (*Pterygoplichthys disjunctivus*).

### Particulares

- Elaborar dietas balanceadas para juveniles de pez blanco, que contengan hidrolizados enzimáticos de pez armado, generados con diferente tiempo de hidrólisis (0, 15, 60 y 240 minutos).
- Evaluar el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco alimentados con las dietas elaboradas.

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE JUVENILES DE PEZ BLANCO (*Menidia estor*),  
ALIMENTADOS CON DIETAS A BASE DE PROTEÍNA HIDROLIZADA DE BAGRE  
ARMADO (*Pterygoplichthys disjunctivus*).

A.M. Avalos-Sánchez.

Laboratorio de Acuicultura, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales,  
UMSNH. Morelia, Michoacán. México. [annamauriav@gmail.com](mailto:annamauriav@gmail.com)

### Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto de dietas elaboradas a base de proteína hidrolizada de bagre armado (*P. disjunctivus*), una fuente de proteína económica y abundante, sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco (*Menidia estor*). Se elaboraron cinco dietas isoproteínicas e isocalóricas (50% proteína, 5% lípidos) (389KCal/100g), cuatro de ellas conteniendo proteína hidrolizada de bagre armado con diferente tiempo de digestión: 0 min (NOH), 15 min (H15MIN), 60 min (H60MIN) y 240 min (H240MIN), y una más como dieta testigo en la cual se reemplazó la proteína de bagre armado por una proteína hidrolizada comercial de pescado\* (TESTIGO). Con ellas se alimentaron a saciedad, seis veces al día, juveniles de pez blanco de 4 meses de posteclosión, durante 60 días.

Los muestreos para evaluar el crecimiento se llevaron a cabo cada dos semanas durante el periodo experimental. Los peces tuvieron un peso promedio inicial de 421.67mg. El mejor crecimiento, en términos de Ganancia de Peso (%) lo obtuvieron los organismos alimentados con las dietas NOH (226.92%), H15MIN (237.65%) y H60MIN (224.20%); mientras que los tratamientos H240MIN y TESTIGO tuvieron el crecimiento más bajo (177.7%). No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los peces sometidos a los distintos tratamientos, la cual fue mayor a 70%. La tasa de conversión alimenticia fue alta en todos los tratamientos, con valores entre 2.08 y 2.89.

La inclusión de la proteína muscular de bagre armado en dietas, en sustitución del hidrolizado comercial de pescado, favorece el crecimiento de *M. estor*, acompañado de un alto porcentaje de supervivencia. Este resultado se obtuvo incluso sin la necesidad del proceso de hidrólisis. Así, el uso de esta fuente de proteína, además de disminuir los costos de producción de alimentos, al emplearse un recurso pesquero abundante, de bajo costo y subutilizado, constituye un avance importante en el desarrollo de una dieta adecuada para el pez blanco y amplía su potencial de aplicación en dietas para otros organismos acuáticos. Esto a su vez,

representa una excelente alternativa de utilización del bagre armado, aminorando el problema ambiental suscitado a raíz de su proliferación en la región y el país.

### **Abstract.**

The aim of this work was to evaluate the effect of diets using hydrolyzed protein from armoured catfish (*P. disjunctivus*), an economic and abundant protein source, on growth and survival of juvenile silverside (*Menidia estor*). Five isoproteinic and isocaloric diets were prepared (50% protein, 5% lipids) (389Kcal/100g), four of them had hydrolyzed protein from armoured catfish with different digestion time: 0 min (NOH), 15 min (H15MIN), 60 min (H60MIN) and 240 min (H240MIN), and another one, the control where the armoured catfish protein was replaced by a hydrolyzed commercial fish protein\* (CONTROL). Silverside juvenile 4 months ph were fed to satiation, six times a day during the for 60 days trial.

Samplings to evaluate growth were carried out every two weeks during the experimental period. The initial average weight of fishes was 421.67mg. The highest growth in terms of gain weight (%) was obtained in those fish fed with the diets NOH (226.92%), H15MIN (237.65%) and H60MIN (224.20%), mean while H240MIN and CONTROL treatments had the lowest growth (177.7%). There were no significant differences in the survival of fish of all the treatments, which was greater than 70%. The feed conversion rate was also high in all the treatments, with values between 2.08 and 2.89.

The inclusion of armoured catfish muscle protein in diets, instead of hydrolyzed commercial fish protein significantly promotes the growth of *M. estor*, with a high survival rate. This good performance was obtained even without the need of a hydrolysis process. Thus, the use of armoured catfish is an important advance in the development an *ad hoc* silverside diet. It also decreases the costs of food production for the species because it uses an abundant and economic fishery resource.

On the other hand this good result opens a possibility of application on aquaculture foods, and as a consequence a promising use for this until now non utilized fish source.

## **Introducción.**

El pez blanco del Lago de Pátzcuaro (*Menidia estor*) es la especie más representativa del Estado de Michoacán por su importancia cultural y económica y sus excelentes cualidades de sabor y talla. Por años fue la base de la pesquería artesanal y dada la gran demanda y potencial comercial de este recurso se capturaron peces de todas las tallas y en todos los estadios de su ciclo biológico (Carta Nacional Pesquera 2002), lo cual provocó una drástica reducción de sus poblaciones, hasta el punto de encontrarse actualmente en peligro (Marez y Morales 2003).

El generar investigación científica y biotecnológica en torno a la implementación del cultivo de esta especie se convierte entonces en una necesidad, ya que además de representar una alternativa para conservar la especie es una fuente generadora de empleos. Tras diez años de investigaciones se han logrado grandes avances en ese sentido, tales como completar su ciclo de vida en cautiverio, tener un control sobre su ciclo reproductivo (Martínez-Palacios *et al.* 2002), conocer sus requerimientos medioambientales (Martínez-Palacios *et al.* 2004), avances en el conocimiento de sus hábitos alimenticios, sus requerimientos nutricionales y sobre su anatomía y bioquímica digestiva (Martínez-Palacios *et al.* 2008). Sin embargo, entre otros aspectos, existen aún algunas limitantes relacionadas a su crecimiento y supervivencia con dietas balanceadas.

Este mal desempeño con dietas balanceadas parece tener su origen tanto en la falta de un sistema digestivo plenamente desarrollado y con baja actividad enzimática, como en la complejidad de las dietas suministradas, con la consiguiente baja disponibilidad de las mismas, y/o a la inclusión de niveles inadecuados de ciertos nutrientes esenciales (Lazo 2000a).

Uno de los aspectos estudiados en los últimos años en muchas especies de interés comercial, es el uso de aminoácidos libres, péptidos pequeños, e incluso proteínas solubles en las dietas. El efecto del suministro de éstos nutrientes es variable dependiendo de la especie, del estadio de vida, y del nivel de inclusión en las dietas. De esta manera, se aumenta el crecimiento y la supervivencia gracias a la eficiencia en su absorción, la mejora de la función digestiva e incluso acelerando el proceso de maduración (Cahu *et al.* 2004, Carvahlo *et al.* 2004, Zambonino *et al.* 1997, Rojas-García y Rønnestad 2002, Anders *et al.* 2006, Cahu y



Zambonino-Infante 1995a, 1995b, Zambonino-Infante y Cahu 2001). Sin embargo, la proteína en esta forma debe ser sustituida en bajos niveles para evitar efectos negativos en los organismos (Carvahlo *et al.* 2004, Zambonino *et al.* 1997, Rønnestad 2002).

El pez blanco posee características anatómicas de un pez zooplanctófago, que carece de estómago y tiene un intestino corto (Ross *et al.* 2006). Esto indica que es un comedor continuo que debe tener a su disposición presas abundantes y altamente digestibles (Martínez-Palacios *et al.* 2008). Por otro lado, los estudios de su bioquímica digestiva han sugerido que presenta una maduración digestiva temprana, aunque la alta y permanente actividad de enzimas citosólicas sugieren más bien una maduración tardía o distinta a la de peces con estómago (Toledo-Cuevas *et al.* 2007). Esto es, al parecer este organismo aun en etapas juveniles se comporta digestivamente como larva (Martínez-Palacios *et al.* 2008).

Por lo anterior, se consideró que la inclusión de nutrientes predigeridos, tales como los hidrolizados proteínicos en dietas para juveniles, podrían mejorar su biodisponibilidad y por tanto permitir un mejor crecimiento y supervivencia de esta especie en cultivo.

El hidrolizado es un producto industrial ampliamente utilizado en la acuicultura como atrayente, fertilizante y fuente de proteína. Además, se ha observado que incrementa significativamente la velocidad de crecimiento de larvas de peces (Berge y Storebakken 1996, Carvahlo *et al.* 2004), lo que aumenta su valor como componente de las dietas.

En el presente trabajo, se ensayó el efecto de la inclusión de proteína muscular de bagre armado sudamericano (*Pterygoplichthys disjunctivus*) con diferentes grados de hidrólisis enzimática, sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco (*Menidia estor*). El pez armado representa un problema ecológico muy importante en la región y el país por su enorme abundancia y nula utilización. No obstante, resultados recientes han mostrado que posee un gran valor nutricional (Martínez-Palacios *et al.* 2010), por lo que constituye una excelente opción para la elaboración de dietas para la acuicultura. De ser exitoso el resultado se constituiría en una buena alternativa de solución a la problemática.

## **Materiales y Métodos**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición y Acuicultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH).

### ***Preparación de hidrolizados enzimáticos de proteína muscular de bagre armado (ensayos preliminares).***

Los bagres armados (*P. disjunctivus*) fueron capturados en la Presa Infiernillo en Michoacán y transportados con hielo al laboratorio. La proteína muscular (filete) fue obtenida mediante cortes manuales con cuchillo, eliminando la piel y las espinas. Ésta fue molida en un molino de carne (Torrey®) y posteriormente almacenada en bolsas de polietileno a -20°C hasta su uso.

Para la preparación de los hidrolizados enzimáticos, la proteína muscular del bagre armado fue homogeneizada en un molino de alto torque (Osterizer®) y posteriormente en un homogeneizador Power Gen® (Fisher Scientific), lo que resultó en una mezcla de consistencia pastosa. Se ensayó la hidrólisis enzimática de este material con dos proteasas comerciales de grado alimenticio (FAO/WHO), con la finalidad de seleccionar aquella que generara un amplio espectro de tamaños de péptidos. Las proteasas empleadas fueron Protamex® y Neutrase® 0.8L (donadas por Novozymes Latin America Ltda), éstas son obtenidas a partir de cepas de *Bacillus licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* (Ficha técnica).

Cada enzima se ensayó a tres diferentes concentraciones: 0.1%, 0.2% y 0.5% (p/v). Para esto se prepararon 200 mL de una mezcla 1:1, con 100g de tejido y 100 mL de agua destilada. El pH de las mezclas fue ajustado a un valor de 7.0 (óptimo para la actividad de ambas enzimas). Este material fue colocado en matraces Erlenmeyer con una capacidad de 1000 mL e incubado a baño maría (Kraft®), a 50±2°C (temperatura óptima para la actividad de ambas enzimas), con agitación horizontal (120 strokes/min). En cada uno de los matraces se incluyeron 50 perlas de vidrio para aumentar la agitación interna del material. Una vez que las muestras alcanzaron la temperatura de 50°C se tomó una muestra de 5mL, que constituyó el tiempo 0 (cero) de hidrólisis. Inmediatamente después se adicionó la enzima respectiva a cada una de las concentraciones a ensayar. Se dejó transcurrir la reacción durante 3 horas, tomando muestras de 5mL cada 15 minutos, de cada una de ellas y de inmediato éstas fueron

inactivadas por tratamiento térmico a 100°C, durante 5 minutos. Posteriormente se colocaron en tubos eppendorf y fueron centrifugadas a 9,200 g por 15 minutos, a 10°C, en una centrífuga Eppendorf® 5415 R. Los sobrenadantes fueron recuperados en tubos eppendorf nuevos. A éstos se les cuantificó proteína soluble por el método de Bradford (1976), utilizando un espectrofotómetro Varian Cary® 50. Como la concentración de proteína fue muy baja en todas las muestras, éstas fueron concentradas por medio de filtros Microcon® YM-3 (Millipore), con membrana de corte (tamaño de poro) de 3 kDa. A éstas muestras concentradas se les cuantificó nuevamente la proteína soluble.

***Determinación del peso molecular de los péptidos obtenidos en los hidrolizados, empleando como referencia hidrolizados comerciales de soya y pescado.***

***a) Mediante cromatografía de filtración en gel.***

Para determinar el peso molecular de péptidos, inicialmente se llevaron a cabo ensayos preliminares con hidrolizados de tilapia, mediante cromatografía de filtración en gel (Nolasco-Soria, Com. Pers.) Sin embargo, dado que no se contó con el equipo necesario en el IIAF-UMSNH, institución donde se llevó a cabo la investigación, las determinaciones se realizaron mediante la técnica SDS-PAGE.

***b) Mediante cromatografía en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).***

Se empleó un sistema discontinuo, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970), con el uso de dos tipos de geles: un gel separador (poliacrilamida al 4%) y un gel concentrador (poliacrilamida al 10 %). Se utilizó una cámara de electroforesis Hoefer Mighty Small® SE250/SE260 mini-vertical.

Antes de cargar las muestras (hidrolizados de bagre armado de diferente tiempo de hidrólisis e hidrolizados comerciales de soya y pescado, como referencia), éstas fueron mezcladas 1:1 con el buffer de carga 2X (0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (p/v), 20% glicerol (v/v), 0.04% azul de bromofenol (p/v), 5% 2-b Mercaptoetanol (v/v)), de forma tal que la cantidad de proteína por pozo fuera de 1.2µg/ml. Posteriormente se calentaron a baño maría por 3 minutos, a 100°C, para desnaturalizar los componentes proteínicos de la muestra; dejándose enfriar después a temperatura ambiente. El mismo tratamiento se le aplicó a los marcadores de peso molecular (MWM) Sigma (No. Cat. SDS7).

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, a 200 volts (100 volts por gel) y 150mA (75 mA por gel), durante 1 hora, utilizando como buffer de corrimiento Tris-HCl, pH 8.3 25mM, 0.1% SDS. Para esto se utilizó una fuente de poder Amersham Pharmacia Biotech® EPS 601.

Una vez finalizada la electroforesis los geles fueron expuestos a una solución de tinción (0.05% Azul de Coomassie R-250 en Metanol al 40% y Ácido Acético al 7%), durante 12 horas, con agitación ligera. Para revelar las bandas de proteína se empleó una solución de Metanol al 40% y Ácido Acético al 10%.

El análisis de los hidrolizados permitió seleccionar a la enzima Protamex® a una concentración de 0.1% como la mejor opción para generar un amplio espectro de tamaños de péptidos. Sin embargo, para incrementar éste, se elaboraron nuevos hidrolizados con tiempos de digestión mayores, desde 0 hasta 16 horas.

#### ***Elaboración de hidrolizados de bagre armado para su inclusión en las dietas experimentales.***

Tomando en cuenta el análisis de perfiles peptídicos obtenidos por electroforesis, se decidió ensayar hidrolizados de pez armado de 0 minutos (mezcla sin enzima), 15, 60 y 240 minutos, en las dietas experimentales, utilizando a la enzima Protamex® a concentración de 0.1% (p/v). Para esto, se siguió el procedimiento descrito en los ensayos preliminares, preparando 4 mezclas, con 2kg de filete de pez armado y 2L de agua destilada. Al finalizar la incubación, nuevamente los productos fueron inactivados por tratamiento térmico, como ya se describió e inmediatamente fueron almacenados en ultracongelación a -80°C.

#### ***Liofilización de hidrolizados.***

Para la preparación de las dietas, se hizo necesario eliminar la humedad de los hidrolizados. Esto se realizó mediante un proceso de liofilización (Labconco® Freeze Dry System Freezone 6). De esta forma se obtuvo un producto sólido e inocuo, que tras su pulverización en un molino de aspas (KRUPS®) permitió su incorporación en las dietas.

#### ***Análisis proximales.***

Se determinó el contenido de humedad, ceniza, extracto etéreo (grasa), proteína (nitrógeno total) y extracto libre de nitrógeno (ELN, una medida indirecta para obtener el contenido de

carbohidratos) de las cuatro mezclas hidrolizadas y liofilizadas, así como de todos los demás ingredientes usados como fuente de proteína en la formulación de las dietas experimentales (Cuadro 1). Del mismo modo, se determinó la composición proximal a las dietas elaboradas (Cuadro 3), y en los peces, antes (iniciales) y después de ser sometidos al protocolo experimental de alimentación con las dietas preparadas (Cuadro 6). Los análisis se llevaron a cabo mediante los procedimientos estándar descritos en la AOAC (2000).

**Cuadro 1.** Composición proximal de los materiales utilizados como fuente de proteína en la preparación de las dietas experimentales. Los datos se expresan en porcentaje de peso seco.

<b>Material o Ingrediente</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Lípidos (g/100g)</b>	<b>Cenizas (g/100g)</b>	<b>ELN (g/100g)</b>	<b>Humedad (g/100g)</b>
Pez armado no hidrol. liof. (0 min.)	90.66±0.04	3.08±0.08	5.11±0.20	1.14±0.15	2.60±0.16
Hidrol. liofilizado de 15 min.	89.11±0.36	3.40±0.09	5.92±0.16	1.56±0.38	9.64±0.04
Hidrol. liofilizado de 60 minutos	88.50±0.26	3.74±0.05	5.64±0.03	2.11±0.23	6.12±0.17
Hidrol. liofilizado de 240 minutos	87.68±0.10	3.58±0.05	5.42±0.02	3.31±0.13	6.52±0.31
Ingrediente 1*	76.71±0.26	17.07±0.18	5.78±0.04	0.43±0.15	5.41±0.05
Ingrediente 2**	86.23±0.31	0.40±0.09	5.95±0.11	7.41±0.47	5.67±0.01
Ingrediente 3**	80.59±0.41	0.00±0.00	3.03±0.09	16.37±0.45	8.55±0.07
Ingrediente 4**	69.00±0.17	2.90±0.08	12.89±0.13	15.16±0.32	6.56±0.13

\* \*\*Ingredientes estándar protegidos por la propiedad industrial. Valores promedio ± desviación estándar (n=3).

### **Formulación de dietas.**

Con base en los resultados de composición proximal de los ingredientes proteínicos se llevó a cabo la formulación de las dietas (Cuadro 2), por el método de tanteo, mediante el uso de hojas de cálculo de Excel®.

Se prepararon 5 dietas experimentales isoproteínicas e isocalóricas (50% proteína, 5% lípidos) (389Kcal/100g), con un porcentaje de inclusión de proteína de pescado de 44% del total de la proteína en las dietas. Éstas se formularon como sigue: una conteniendo proteína hidrolizada comercial de pescado\* (TESTIGO), y el resto sustituyendo este hidrolizado por los

hidrolizados liofilizados de pez armado con diferente tiempo de digestión: 0 min (NOH), 15 min (H15MIN), 60 min (H60MIN) y 240 min (H240MIN). Adicionalmente, se utilizaron tres materiales mas como fuente de proteína, en proporción y cantidad constante para todas las dietas\*\*. El resto de los ingredientes empleados fueron: como fuente de lípidos, aceite de pescado, aceite de soya y colesterol, como fuente de carbohidratos, almidón crudo, una premezcla de vitaminas y minerales (Rovimix Peces Carnívoros 6.5), vitamina C (Rovimix Stay C 35), lecitina de soya (para generar la emulsión), alginato de sodio y goma arábica como aglutinantes, BHT como antioxidante y tierra de diatomea como relleno inerte.

**Cuadro 2.** Formulación de las dietas experimentales con la inclusión de los hidrolizados (liofilizados) de bagre armado de diferentes tiempos de digestión.

Ingrediente	Tratamientos (g/100g)				
	TESTIGO	NOH	H15MIN	H60MIN	H240MIN
<b>Pez Armado</b>	----	24.91	27.32	26.48	26.84
<b>Ingrediente 1*</b>	30.32	----	----	----	----
<b>Ingrediente 2**</b>	15.37	15.37	15.37	15.37	15.37
<b>Ingrediente 3**</b>	20.35	20.35	20.35	20.35	20.35
<b>Ingrediente 4**</b>	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
<b>Aceite de pescado</b>	0.00	1.69	1.60	1.51	1.54
<b>Aceite de soya</b>	0.02	2.48	2.48	2.48	2.48
<b>Almidón</b>	10.00	11.27	8.95	9.88	9.48
<b>BHT</b>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<b>Tierra de diatomea</b>	9.71	9.71	9.71	9.71	9.71
<b>Premezcla de vitaminas y min.</b>	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50
<b>Colesterol</b>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
<b>Alginato de sodio</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>Goma arábica</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>Vitamina C</b>	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
<b>Lecitina de soya</b>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
<b>ENERGÍA (KCal/100g)</b>	388.62	394.48	385.35	389.76	389.39

\* \*\*Ingredientes estándar protegidos por la propiedad industrial y usados siempre en la misma proporción.

Todos los ingredientes fueron pesados por separado en una balanza analítica (Metler-Toledo® PB153-S), con excepción del BHT, vitamina C y colesterol, que fueron pesados en una microbalanza (Metler-Toledo® MX5).

#### ***Elaboración de dietas experimentales.***

Una vez formuladas las dietas y pesados los ingredientes para cada una, estas fueron elaboradas a partir de varias mezclas, que finalmente fueron conjuntadas, de acuerdo al siguiente procedimiento: inicialmente se preparó un gel con alginato de sodio y agua caliente. En este se añadieron los aceites de soya y pescado, la lecitina de soya y el BHT, hasta obtener una emulsión. Por otro lado, se preparó un gel con la mitad del almidón a utilizar y agua caliente. Cuando éste y la emulsión estuvieron a temperatura ambiente, fueron mezclados con un homogeneizador Power Gen® (Fisher Scientific).

Por otro lado, las vitaminas y minerales, el colesterol, la goma arábica y la tierra de diatomea se premezclaron en seco. Por separado, el resto de los ingredientes sólidos también se mezclaron para posteriormente ser incorporadas ambas mezclas de sólidos. Por último, a estos sólidos se les adicionó la mezcla formada por la emulsión y el gel, incorporándose en una mezcladora de uso domestico (Kitchen Aid® modelo Artisan), hasta obtener una pasta consistente y homogénea, que se colocó sobre papel encerado. Este material que constituía las dietas experimentales, fue secado en un desecador de aire forzado durante 12 horas a 35°C.

Una vez deshidratado el material, se obtuvo un alimento en forma de “churro”, que fue quebrado manualmente y cribado en una batería de tamices Alcon, a los tamaños de partícula apropiados para la alimentación de los peces (420-800 $\mu$  y 800-1000 $\mu$ ). El alimento así preparado se almacenó a -20°C en recipientes de plástico, hasta su uso. Se tomaron muestras de cada una de las dietas para realizar análisis proximales (AOAC, 2000) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis bromatológico de las dietas experimentales. Los datos se expresan en porcentaje de peso seco.

<b>Dieta</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Lípidos (g/100g)</b>	<b>Cenizas (g/100g)</b>	<b>ELN (g/100g)</b>	<b>Humedad (g/100g)</b>
<b>TESTIGO</b>	52.15±0.18	10.07±0.35	18.76±0.04	19.02±0.36	8.41±0.02
<b>NOH</b>	52.00±0.07	7.92±0.15	18.12±0.03	21.95±0.25	5.08±0.01
<b>H15MIN</b>	53.21±0.05	7.97±0.11	18.52±0.05	20.29±0.04	5.84±0.02
<b>H60MIN</b>	52.76±0.14	10.21±0.12	18.41±0.05	18.62±0.20	7.97±0.08
<b>H240MIN</b>	52.76±0.08	10.21±0.60	18.36±0.03	18.67±0.63	8.27±0.03

Valores promedio ± desviación estándar (n=3).

### *Sistema experimental.*

Se utilizaron organismos juveniles de *M. estor* de 4 meses de edad, cultivados en la planta de producción del IAF-UMSNH. El experimento consistió de 5 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas elaboradas. Cada tratamiento se analizó por triplicado, lo que nos dio un total de 15 unidades experimentales.

Para cada tratamiento se utilizaron 90 organismos (30 por réplica), los cuales fueron sembrados en un sistema de recirculación en canaletas de 180L de capacidad. Las condiciones ambientales fueron las utilizadas rutinariamente para el cultivo del pez blanco: Salinidad de 5‰, temperatura de 25°C, aireación constante y fotoperiodo 12L: 12D. Los peces se aclimataron en el sistema experimental durante una semana antes de dar inicio al experimento. Durante este tiempo se alimentaron con nauplios de *Artemia franciscana* y hojuela comercial, siguiendo el esquema de alimentación que se lleva en la Planta de Producción de Pez Blanco. Posteriormente, al iniciar el protocolo experimental, se inició la alimentación únicamente con las dietas a ensayar.

Las dietas se suministraron diariamente a saciedad, cada dos horas, seis veces al día, siendo la primera alimentación a las 9:00 horas y la última a las 19:00 horas, durante 60 días. Los muestreos de crecimiento se llevaron a cabo cada dos semanas, los días 0, 15, 30, 45 y 60 de cultivo. Para esto, los peces fueron anestesiados con una solución de Benzocaína a 24mg/L, con la finalidad de reducir el estrés y facilitar su manejo (Ross *et al.* 2007). Una vez anestesiados, los organismos fueron contados y transferidos a una red para retirar el exceso de



agua con toallas absorbentes. Luego se colocaron en un recipiente con agua (previamente tarado) sobre una balanza (Denver Instrument® APX-6001), para registrar la biomasa de los peces de cada unidad experimental y de cada tratamiento. También se registraron diariamente la cantidad de alimento consumido, tomando su peso seco (mg) antes y después de suministrarlo a los peces de cada unidad experimental, así como la supervivencia de los organismos.

Con los datos obtenidos se evaluó el crecimiento, calculando: la tasa específica de crecimiento (TEC) (Brown 1987), peso ganado (PG) y ganancia de peso individual (GPI). En cuanto a la eficiencia alimenticia, se calculó: el alimento consumido individual (ACI), biomasa corporal diaria (BCD), tasa de conversión alimenticia (TCA) (Harfush 1992), consumo de proteína (CP), consumo de nitrógeno (CN), y tasa de eficiencia proteínica (PER).

#### ***Calidad del agua.***

Se midieron: la temperatura, oxígeno disuelto y salinidad diariamente antes de la primera alimentación, usando un termómetro de mercurio, un oxímetro digital (YSI-51B) y un refractómetro (Atago-S/Mill-E). Asimismo, se midieron las concentraciones de amonio total y nitritos con un equipo Hach-Fish® Farming Marine, dos veces por semana, y el pH con un potenciómetro digital (Fisher Scientific® AB15). La limpieza del sistema se realizó diariamente al final de la última alimentación, mediante el sifoneo de las canaletas, con recambios de agua del 90%.

#### ***Análisis Estadísticos.***

A los datos obtenidos de crecimiento, supervivencia, consumo de alimento y eficiencia alimenticia se les aplicó una prueba de normalidad y homocedasticidad. Posteriormente se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) a una vía, con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Se utilizó la prueba de Tukey para hacer la comparación de medias entre tratamientos, con el programa MINITAB 13.2.

## **Resultados Discusión.**

### ***Perfil peptídico de los hidrolizados.***

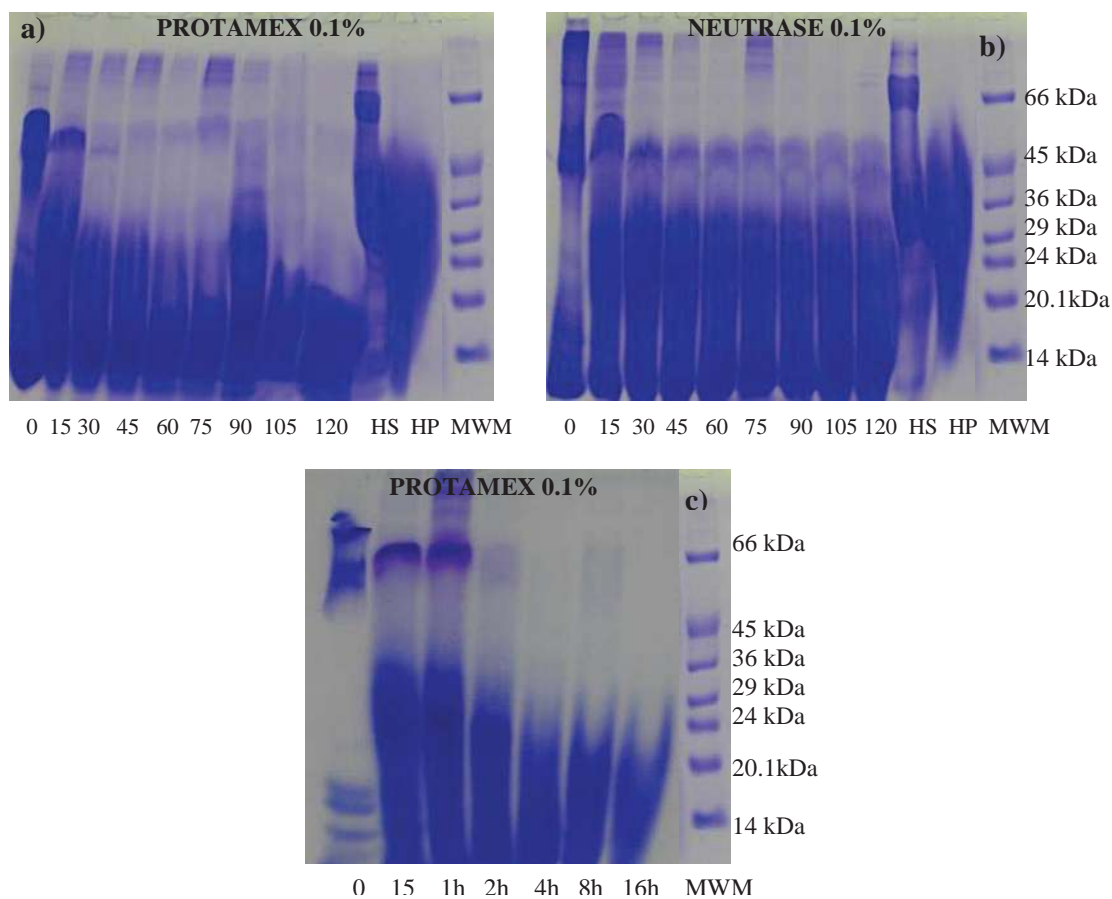
Un hidrolizado proteínico está formado por péptidos de diferentes tamaños, originados por la hidrólisis de proteínas (Kristinsson y Rasco 2000), que en general presentan una mayor biodisponibilidad para los organismos (Silk *et al.* 1985, Wee 1992). De entre las tecnologías existentes, como la hidrólisis química y enzimática (Guadix *et al.* 2000), en este trabajo se optó por la hidrólisis enzimática, ya que las condiciones de reacción (sin temperatura o pH extremos, ni la inclusión de solventes orgánicos) permiten obtener un producto final de alto valor nutritivo.

De acuerdo a lo observado por diversos autores en varias especies de peces (Rønnestad *et al.* 2001 y 2003, Carvahlo *et al.* 1997, 2004, Savoie *et al.* 2006, Cahu y Zambonino-Infante 1995b, Zambonino *et al.* 1997), la inclusión de proteínas de diversa calidad en dietas balanceadas, han generado buenos crecimientos, por lo que en este trabajo se buscó que los productos a incluir en las dietas tuvieran estos componentes proteínicos, es decir péptidos de distinto tamaño, aminoácidos libres y proteínas sin hidrolizar.

Los hidrolizados de bagre armado de los ensayos preliminares, fueron analizados mediante la metodología de SDS-PAGE (Fig.1). Como referencia de tamaños de péptidos se utilizaron hidrolizados comerciales de soya (HS) y de pescado (HP). Éstos habían sido ya ensayados con juveniles de pez blanco, obteniendo un crecimiento aceptable con el HS, por encima del obtenido con el HP (Martínez-Palacios, Com. Pers.). Dado que el perfil de aminoácidos entre el HS y el HP es muy semejante (Sanchez-Chinchillas, Com. Pers.), se consideró que pudiera ser el tamaño de los péptidos el elemento clave para esta diferencia en la respuesta de crecimiento de los peces. Así, tomando como base los tamaños de péptidos de los hidrolizados comerciales, se determinaron las condiciones a emplear (enzima comercial a utilizar, la concentración y el tiempo de digestión más adecuados), para obtener perfiles peptídicos con espectros más amplios de pesos moleculares, con los que se elaboraron las dietas experimentales.

Se hace notar que el amplio espectro de tamaños de péptidos en los hidrolizados de proteínas, no permite observar bandas bien definidas en el análisis electroforético (SDS-PAGE). Pese a

esto y a sus limitaciones en la separación de péptidos de bajo peso molecular, esta técnica ha sido la más usada para la caracterización de hidrolizados y proteínas (Guadix *et al.* 2000).



**Figura 1.** Geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, teñidos con azul de Coomassie. **a)** Protamex, y **b)** Neutrased al 0.1%. Carriles 1-9 digestión de 0 a 120 min. Carril 10, hidrolizado comercial de soya (HS). Carril 11, hidrolizado comercial de pescado (HS). Carril 12, Marcador de peso molecular de 14,000 a 66,000 Da (MWM). **c)** Protamex al 0.1%. Carriles 1-7, digestión de 0 a 16 hrs, carril 8 MWM.

En la figura 1 a) y b) se observa que la concentración 0.1% para ambas enzimas, con un tiempo de digestión de 15 minutos, permite generar un perfil peptídico semejante al de HS, con pesos moleculares de entre 29 y 45,000 Da (daltones), siendo Neutrased® menos activa que Protamex®. Se observa también que en el caso de Neutrased® el efecto hidrolítico disminuye a partir de los 15 minutos, mientras con Protamex® se pueden obtener péptidos de menor tamaño, encontrándose la mayoría por debajo de los 20,000 Da (Fig. 1c). Las

concentraciones de 0.2% y 0.5% de ambas enzimas resultaron ser muy altas, en relación a los tamaños de péptidos que se buscaban, ya que hidrolizaron toda la proteína a partir de los primeros minutos.

De esta manera se determinó que Protamex®, a una concentración de 0.1% (p/v), sería la enzima y concentración a utilizar para elaborar los hidrolizados que serían incluidos en las dietas. Asimismo se establecieron tres tiempos de digestión para obtener un perfil peptídico representativo de este protocolo de digestión: 0, 15, 60 y 240 minutos.

Creemos que la consistencia pastosa del material a hidrolizar (mezcla 1:1; proteína muscular de bagre armado y agua) dificultaba la rápida hidrólisis de las proteínas. Esto con base en que la cantidad de sedimento obtenido tras el proceso de hidrólisis y centrifugación posterior, disminuía en cantidad al aumentar el tiempo de digestión. De aquí que podía considerarse que un mayor tiempo de hidrólisis no solo permitía generar péptidos más pequeños y aminoácidos libres, sino una mayor cantidad de ellos, lo que podría tener un impacto en el crecimiento de los organismos. No obstante esto no fue cuantificado.

***Crecimiento de juveniles de pez blanco (M. estor) alimentados con dietas a base de hidrolizados proteínicos de bagre armado (P. disjunctivus).***

***Calidad del agua.***

Los parámetros fisicoquímicos dentro del sistema de recirculación, durante el periodo de experimentación, se muestran en el Cuadro 4, los cuales se mantuvieron en los niveles considerados adecuados para la especie (Martínez-Palacios *et al.* 2002, 2004).

**Cuadro 4.** Parámetros fisicoquímicos de calidad del agua.

Temperatura (°C)	25±0.02
Salinidad ‰	5±0.05
Oxígeno disuelto (mg/L)	5.5±0.09
Amonio Total (mg/L)	ND
Nitritos (mg/L)	0.01±0.00
pH	8.0±0.03

Valores promedio ± desviación estándar. ND, No Detectable

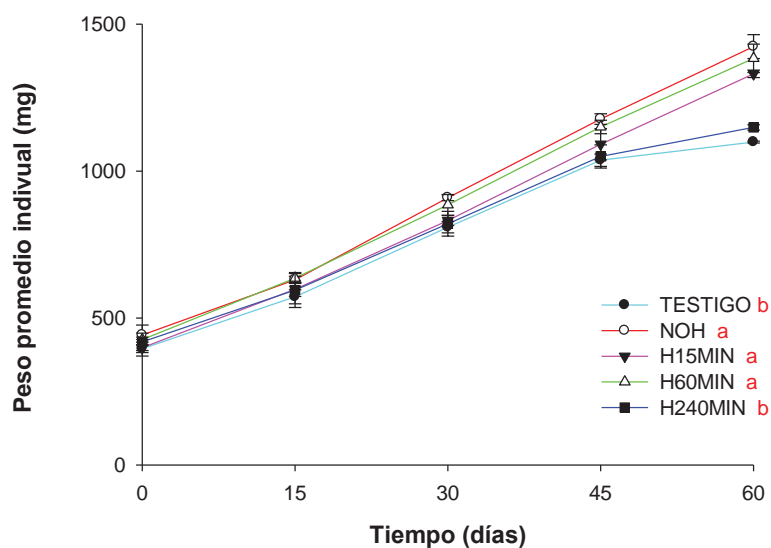
### ***Crecimiento.***

El pez blanco (*M. estor*) es un organismo que posee hábitos alimenticios y características de un carnívoro filtrador, con un intestino corto y un sistema de filtración orobranquial (Ross *et al.* 2006). Por otro lado, carece de estómago y ciegos pilóricos. En cuanto a su capacidad digestiva parece tener una mayor importancia la digestión citosólica que la luminal durante la etapa larvaria, e incluso parece ser aún mayor en juveniles, al menos a los 90 días de posteclosión (Toledo- Cuevas *et al.* 2007). Esto muestra la alta capacidad proteolítica compensatoria de la ausencia de estómago, pero contradice una importante característica del modelo de maduración digestiva descrita para peces con estómago: la disminución de la actividad de las enzimas citosólicas, coincidente con el aumento en la actividad de las enzimas de borde de cepillo (Zambonino Infante y Cahu 2001, Kolkovski 2001). Así que pareciera ser que los organismos de pez blanco no maduran digestivamente durante este periodo o tienen un modelo de maduración diferente al descrito para peces marinos con estómago (Martínez-Palacios *et al.* 2008)

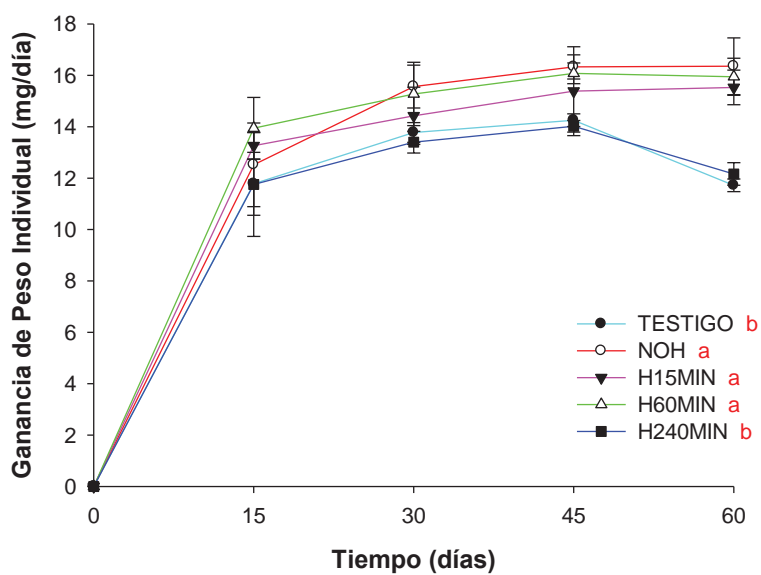
Las características antes mencionadas parecen sugerir que el pez blanco requiere tener acceso a alimento altamente digestible. Por esta razón, y por los ya mencionados resultados de mejora del crecimiento en peces con la inclusión en las dietas de aminoácidos y péptidos (Rønnestad *et al.* 2000), se consideró suplementar la dieta con proteínas prehidrolizadas de bagre armado, para favorecer el crecimiento de estos organismos.

A continuación (Fig. 2), se muestran los resultados de crecimiento en Peso Promedio Individual de los peces alimentados con los diferentes tratamientos, a lo largo del periodo de experimentación. El peso promedio inicial de los peces fue de  $421.67 \pm 24.95$ mg, sin diferencia significativa entre tratamientos ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 5).

El mejor crecimiento en peso promedio individual (alrededor de 1379mg) se obtuvo con las dietas que contenían pez armado sin hidrolizar (NOH), pez armado hidrolizado de 15 (H15MIN) y de 60 minutos (H60MIN), sin mostrar diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ). Por el contrario, el desempeño en cuanto a crecimiento de los peces en el tratamiento con hidrolizado de 240 minutos (H240MIN) y en el testigo (que no contenía pez armado) (TESTIGO), fue menor ( $P > 0.05$ ). Este patrón de resultados se repite en los datos obtenidos de Ganancia de Peso Individual (GPI) (Fig. 3) y biomasa corporal diaria (BCD) (Cuadro 5).



**Figura 2.** Crecimiento de juveniles de *M. estor*, alimentados durante 60 días con las distintas dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Valores promedio  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ).



**Figura 3.** Ganancia de peso individual de juveniles de *M. estor*, alimentados durante 60 días con las distintas dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Valores promedio  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ).

El hecho de que las dietas con hidrolizados de 15 (H15MIN) y 60 minutos (H60MIN) hayan promovido el mismo crecimiento que la dieta con pez armado sin hidrolizar (NOH), puede tener tres posibles explicaciones. La primera de ellas sería que ese tiempo de digestión produjo en su mayoría péptidos aun relativamente grandes (entre 24,000 y 66,000 Da), cuyo tamaño no permitió que se produjera el efecto positivo reportado en el crecimiento en otros peces (Carvahlo *et al.* 1997 y 2004, Zambonino *et al.* 1997, Rønnestad *et al.* 2001, Savoie *et al.* 2006). La segunda, que la ya mencionada consistencia pastosa de la mezcla a hidrolizar no haya favorecido una alta digestión de este material, por lo que la cantidad de péptidos y aminoácidos libres producidos pudo ser baja. La última posibilidad podría ser que aunque si se hay producido un tamaño y cantidad de péptidos adecuado para estimular una respuesta positiva en el desempeño de los organismos, los peces blancos objeto de este estudio, con una edad de 4 meses de posteclosión, se encontraran ya en una etapa del proceso de maduración digestiva en la que fueran insensibles al efecto de dichos nutrientes (Cahu y Zambonino-Infante 1995 a y 1995b, Zambonino-Infante y Cahu 2001, Cahu *et al.* 2004). Esto a pesar de que los peces agástricos, como *M. estor*, parecen mantener una digestión citosólica tipo larvaria durante todo su periodo de vida.

Desafortunadamente, la no cuantificación de los péptidos producidos durante este proceso de hidrólisis enzimática y el no contar con toda la información acerca del tamaño de péptidos que en otros peces han tenido un efecto positivo en el desempeño, además de no conocer el periodo y modelo de maduración digestiva del pez blanco, no nos permite determinar cuál de éstas hipótesis es la correcta. Lo anterior debido a que en la mayoría de los trabajos a los que se ha hecho referencia, se evalúa la respuesta de los organismos en cuanto a porcentajes de inclusión de hidrolizado en las dietas, o al grado de hidrólisis (GH%) y no en cuanto a tiempos de digestión y tamaños de péptidos, como en el presente trabajo.

Actualmente está siendo estudiado el modelo de maduración digestiva del pez blanco. Sin embargo, un trabajo como el presente, con inclusión de péptidos y aminoácidos en la dieta puede ser ensayado en larvas de pez blanco, que podrían responder de manera favorable a éstas por ser posiblemente susceptibles a “madurar” digestivamente. Los hidrolizados pueden ser empleados para elaborar dietas microagregadas o secadas por spray dry (Medina-Reyna *et al.* 2000), requeridas para larvas en las que son necesarios tamaños de partícula muy pequeños por su reducido tamaño de boca (Walford *et al.* 1991, Cahu y Zambonino-Infante 1994).

Por otro lado, como ya se mencionó las dietas con hidrolizado de 240 minutos (H240MIN) y la TESTIGO, con proteína hidrolizada comercial de pescado\*, presentaron el más bajo crecimiento. Esta respuesta puede tener también su origen en la ya mencionada posible etapa insensible (Cahu y Zambonino 2001) en la que se pudieron encontrar los peces blancos usados en este trabajo. No obstante, existen otras varias explicaciones a este efecto negativo en el crecimiento. Una de ellas es que la cantidad de péptidos y aminoácidos libres producidos en este tiempo de digestión haya sido considerablemente mayor que con los tiempo de hidrólisis más cortos (aunque esto no se cuantificó, se induce por la cantidad de material no hidrolizado reflejado en la cantidad de sedimento obtenido tras la centrifugación), lo cual podría estar ejerciendo un papel negativo sobre el crecimiento y supervivencia, como ocurre en otras especies de peces, tales como la carpa común (*C. carpio*), que también es un pez agástrico (Carvalho *et al.* 2004), la lubina (*D. labrax*) (Zambonino *et al.* 1997), salmón (*S. salar*) (Hevrøy *et al.* 2005) y la dorada (*Sparus aurata*) (Kolkovski y Tandler 2000).entre otras especies (Espe y Lied 1994, Berge *et al.* 1994, Zárate *et al.* 1999), en las que altos porcentajes de inclusión de hidrolizados deprimieron el crecimiento. Asimismo, algunos estudios han reportado menor crecimiento y pobre eficiencia de asimilación en peces adultos alimentados con dietas que contienen altos niveles de aminoácidos libres en comparación con las dietas que contienen proteína intacta de idéntica composición de aminoácidos (Espe y Lied 1994; Berge *et al.* 1994; Zárate *et al.* 1999).

Esta respuesta negativa en el desempeño de los organismos se puede atribuir a una posible saturación de los sistemas de transporte intestinales, pues existe competencia de varios aminoácidos (p.ej. Met, Val y Thr) por los mismos transportadores, teniendo los di y tripeptidos sistemas de transporte independientes, por lo que se cree que la absorción de estos es más eficiente (Jobling 1994). O por el contrario, puede haber un flujo tan rápido de péptidos y aminoácidos a través del sistema digestivo que estos no alcanzan a ser absorbidos (Cahu *et al.* 1999, Kolkovski y Tandler 2000). El destino de los aminoácidos depende de los requerimientos proteínicos del pez, por ejemplo para que se dé una síntesis efectiva de proteínas, el organismo requiere tener disponibles gran cantidad de aminoácidos (Cowey 1995), sin embargo dado que estos no se almacenan (como los carbohidratos y lípidos), cuando existe un exceso (poza de aminoácidos) éstos son desechados (Jobling 1994).

Por otro lado, cabe considerar la posible pérdida de aminoácidos libres en la dieta con hidrolizado de 240 min, pues a mayor grado de hidrólisis el material tiene mayor capacidad de



absorción de agua (Belen *et al.* 2007), y por el proceso de elaboración de estas dietas, esto pudo haber provocado mayor lixiviación.

Un mecanismo mas por el que los aminoácidos libres pueden estar afectando el crecimiento puede ser por la estimulación en la secreción de tripsina (como ocurre en la lubina *D. labrax*), la cual a su vez inhibe la secreción de CCK que estimula la función digestiva (Cahu y Zambonino 1995b).

Retomando los resultados referentes al mejor crecimiento, se mencionó que éste se obtuvo tanto en la dieta con pez armado sin hidrolizar, como en las de 15 y 60 min. Esto significa que no fue necesaria la hidrólisis de proteínas para obtener una buena respuesta en los organismos, lo que representa la ventaja de economizar y facilitar el proceso de preparación del alimento. Además, al no ser un producto de hidrólisis no se presentan aminoácidos libres, con lo que se evita la pérdida de nutrientes

Cabe resaltar que el crecimiento obtenido con el pez blanco en este trabajo, es el mejor que hasta el momento se ha logrado con dietas balanceadas (229% de peso ganado en dos meses de experimentación), incluso similar al observado en organismos alimentados con nauplios de *Artemia* enriquecidos con vitamina C y ácidos grasos poli y altamente poli-insaturados (PUFA y HUFA) (220% de peso ganado en tres meses de experimentación) (Ríos-Durán 2007). Aunque es probable que el exitoso crecimiento obtenido con las dietas balanceadas del presente trabajo también sea en respuesta a la edad de los peces utilizados, considerada de crecimiento exponencial (Rønnestad *et al.* 1999). Éstos resultados son validos como antecedentes en el uso de dietas preparadas que sustituyan el suministro de presas vivas en el cultivo de pez blanco.

Finalmente es de gran interés mencionar que el mejor crecimiento se obtuvo con las dietas experimentales que incluían al bagre armado (excepto la de mayor tiempo de digestión, como ya se discutió). Así que, aunque no se conoce si otro recurso pesquero pudiera proporcionar mejores resultados en el pez blanco, este exitoso resultado es relevante ya que da la pauta de su potencial aplicación como ingrediente para dietas de otras especies acuícolas, por lo que su utilización en la acuicultura puede constituir una de las soluciones al problema ecológico que el bagre armado representa en el país.

### ***Crecimiento y eficiencia alimenticia.***

En el cuadro 5 se muestran los resultados de peso inicial y peso final de los peces sometidos a los distintos tratamientos, así como todos los parámetros que permiten la evaluación de la eficiencia alimenticia, tales como: peso ganado, ganancia de peso individual, alimento consumido individual, tasa de conversión alimenticia, tasa específica de crecimiento, entre otros.

Como ya se mencionó, los mejores tratamientos fueron NOH, H15MIN y H60MIN, significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) de los tratamientos H240MIN y TESTIGO, únicamente en cuanto al Peso Final (mg), Ganancia de Peso Individual (mg/día) y la Biomasa Corporal Diaria.

**Cuadro 5.** Crecimiento y eficiencia alimenticia

<b>Parámetro</b>	<b>Tratamiento</b>				
	<b>TESTIGO</b>	<b>NOH</b>	<b>H15MIN</b>	<b>H60MIN</b>	<b>H240MIN</b>
<b>Peso Inicial (mg)</b>	395.56±13.10a	442.22±33.90 <sup>a</sup>	398.89±28.04a	426.67±8.39a	418.89±29.46a
<b>Peso Final (mg)</b>	1098.67±3.36b	1423.52±40.50 <sup>a</sup>	1330.74±12.73a	1383.47±48.50a	1148.62±9.05b
<b>Peso Ganado (%)</b>	178.40±3.36a	226.92±33.85 <sup>a</sup>	237.65±28.75a	224.20±8.35a	177.00±19.97a
<b>GPI (mg/día)</b>	11.72±0.25b	16.35±1.11 <sup>a</sup>	15.53±0.67a	15.95±0.72a	12.16±0.44b
<b>ACI (mg/día)</b>	33.44±1.30a	35.34 2.16 <sup>a</sup>	33.11±1.70a	33.12±1.50a	34.93±1.33a
<b>TCA</b>	2.86±0.17a	2.19±0.23 <sup>a</sup>	2.14±0.17a	2.08±0.04a	2.89±0.45a
<b>TEC (%/día)</b>	1.70±0.06a	1.96±0.17 <sup>a</sup>	2.02±0.14a	1.96±0.04a	1.69±0.12a
<b>BCD (%/día)</b>	3.04±0.12b	2.49±0.17 <sup>a</sup>	2.49±0.14a	2.39±0.06a	3.04±0.11b
<b>CP (mg/día)</b>	16.72±0.65a	17.67±1.08 <sup>a</sup>	16.55±0.85a	16.56±0.75a	17.47±0.66a
<b>CN (mg/día)</b>	2.57±0.10a	2.72±0.17 <sup>a</sup>	2.55±0.13a	2.55±0.12a	2.69±0.10a
<b>PER</b>	0.70±0.04a	0.94±0.11 <sup>a</sup>	0.94±0.07a	0.96±0.02a	0.70±0.05a

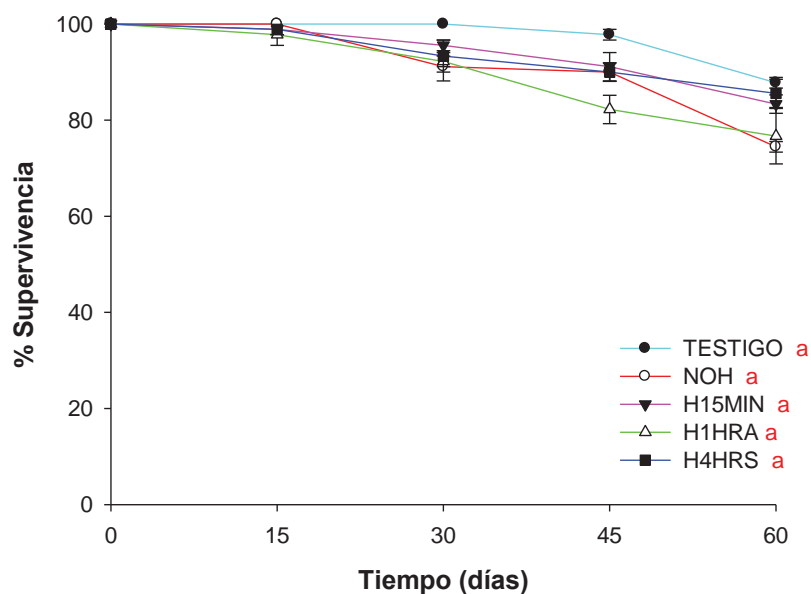
GPI= Ganancia de Peso Individual. ACI= Alimento Consumido Individual. TCA= Tasa de Conversión Alimenticia. TEC= Tasa Específica de Crecimiento. BCD= Biomasa Corporal Diaria. CP= Consumo de Proteína. CN= Consumo de Nitrógeno. PER= Tasa de Eficiencia Proteínica. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Valores promedio ± error estándar (n=3).

En cuanto a los demás parámetros de eficiencia alimenticia, la cantidad de alimento consumido por día fue similar en todos los tratamientos, sin diferencia significativa entre ellos ( $P>0.05$ ). En cuanto a la Tasa de Conversión Alimenticia, y la Tasa Específica de Crecimiento, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.05$ ), siendo buena en todos ellos, ya que aunque el valor óptimo de TCA es de 1, un valor de alrededor de 2, como el obtenido en este trabajo se considera bueno, comparado con el que se ha encontrado en otros trabajos. Asimismo, el Consumo de Proteína, el Consumo de Nitrógeno y la Tasa de Eficiencia Proteínica (PER) fue similar en todos los tratamientos, sin presentar diferencia significativa ( $P>0.05$ ). En contraste un valor de PER, similar al obtenido en este trabajo (0.94), se encontró en juveniles de *Nibeia japonica* alimentados con un 30% de proteína en la dieta, éste resultado fue mejor cuanto más alto era el nivel de inclusión de proteína (1.90, en dietas con 45% de proteína) (Moon Lee *et al.* 2001).

A través del cálculo de los parámetros de consumo de alimento y eficiencia alimenticia se observa que, en general todos los tratamientos fueron eficientes. Esto confirma que, el bagre armado con o sin el proceso de hidrólisis, es una excelente fuente de proteína que puede sustituir totalmente a un hidrolizado comercial de pescado\* de alto costo en el mercado, obteniéndose altos crecimientos de los organismos. Además como ya se había citado, el uso del bagre armado podría disminuir los costos de producción de los alimentos.

### Supervivencia.

La supervivencia obtenida con los cinco tratamientos fue superior al 70%, sin diferencia significativa entre ellos ( $P>0.05$ ) (Fig. 4). Un resultado como este, en juveniles de pez blanco alimentados con dietas balanceadas se considera muy bueno. Esta tasa de supervivencia se atribuye a la eficiencia de las dietas balanceadas con incorporación de proteínas hidrolizadas (Cahu y Zambonino Infante 2001).



**Figura 4.** Supervivencia de juveniles de *M. estor*, alimentados durante 60 días con los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P>0.05$ ). Valores promedio  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ).

### **Composición proximal de los peces.**

En el cuadro 6 se muestra la composición proximal de los juveniles de pez blanco antes (peces iniciales) y después de ser alimentados con las dietas experimentales.

**Cuadro 6.** Composición proximal de juveniles alimentados con las dietas experimentales. Los datos se expresan en porcentaje del peso seco.

<b>Análisis proximal del cuerpo de los peces iniciales y finales (g/100g)</b>					
<b>Tratamiento</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lípidos</b>	<b>Cenizas</b>	<b>ELN</b>	<b>Humedad</b>
<b>Peces Iniciales</b>	66.33±1.63b	8.37±0.33e	15.82±0.03b	9.48±1.99a	80.62±1.94a
<b>TESTIGO</b>	69.07±0.15a	10.77±0.16d	16.55±0.20a	3.60±0.49b	79.76±0.52a
<b>NOH</b>	67.30±0.14ab	14.39±0.10b	14.88±0.13c	3.42±0.10b	79.84±0.34a
<b>H15MIN</b>	67.29±0.23ab	17.37±0.06a	12.26±0.22e	3.08±0.46b	76.94±0.60a
<b>H60MIN</b>	67.68±0.31ab	17.84±0.20a	13.61±0.07d	0.86±0.17c	77.41±0.67a
<b>H240MIN</b>	69.01±0.31a	13.44±0.11c	16.55±0.12a	1.00±0.28c	79.45±0.46a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $P>0.05$ ). Valores promedio  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ).

El contenido de humedad de los peces iniciales y finales de los distintos tratamientos fue de entre 76 y 80% sin presentarse diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre ellos.

El mayor componente de interés nutricional es la proteína, seguido del contenido graso, ceniza y ELN (carbohidratos), los cuales son presentados en porcentaje del peso seco. A pesar de que las dietas formuladas fueron isoproteínicas e isocalóricas, y se suministraron a los peces a saciedad y bajo las mismas condiciones de cultivo, la depositación de cada nutriente en el tejido de los organismos experimentales en cada tratamiento fue diferente.

En cuanto al contenido de proteína, los peces iniciales tuvieron el valor más bajo, aunque sin diferencia significativa ( $P>0.05$ ) con el encontrado en los peces finales de los tratamientos NOH, H15MIN y H60MIN, pero diferente significativamente ( $P<0.05$ ) del porcentaje de proteína de los tratamientos TESTIGO y H240MIN y éstos sin diferencia significativa entre ellos ( $P>0.05$ ) ni con los anteriores. Esto quiere decir que no se presentaron diferencias en la

deposición de la proteína en el cuerpo de los peces después de ser sometidos a los diferentes tratamientos.

Este resultado también se relaciona con los parámetros reportados en el cuadro 5, en los que no se encuentran diferencias entre las tasas de conversión alimenticia (TCA), tasa específica de crecimiento (TEC) y tasa de eficiencia proteínica (PER). Las proteínas son la principal fuente de energía para los organismos acuáticos, estos son capaces de obtener más energía metabolizable a partir del catabolismo de proteínas que de los carbohidratos, en contraste con los animales terrestres (Cowey *et al.* 1975).

Por otro lado, el mayor contenido de lípidos lo presentaron los tratamientos H15MIN y H60MIN, sin diferencia significativa entre ellos ( $P > 0.05$ ), pero si con el resto de los tratamientos. Seguidos por el tratamiento NOH, H240MIN, TESTIGO y por último los peces iniciales con el valor más bajo de lípidos. Con base en estos resultados se observa una mayor deposición de grasa en el tejido, consistente con los resultados de aumento de peso individual de los organismos. Un patrón de resultados similar en cuanto al porcentaje de lípidos corporales, se observó en juveniles de *Nibeia japonica* alimentados con dietas que contenían altos niveles de proteína (45-55%) comparados con los alimentados con dietas que contenían bajos niveles (30-35%), lo que indica que la cantidad y calidad de la proteína de las dietas está relacionada con el contenido de lípidos en el cuerpo (Moon Lee *et al.* 2001).

En lo que corresponde al contenido de cenizas, el mayor porcentaje lo tuvieron los peces alimentados con las dietas TESTIGO y H240MIN, sin presentar diferencia significativa entre ellos ( $P > 0.05$ ), pero si con los tratamientos NOH, H15MIN, H60MIN y peces iniciales, siendo éstos significativamente diferentes entre sí ( $P < 0.05$ ).

El valor del extracto libre de nitrógeno (ELN) fue mayor para los peces iniciales, significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) al resto de los tratamientos. Los valores de los peces de los tratamientos TESTIGO, NOH y H15MIN fueron similares entre sí, significativamente diferentes de los del H60MIN y H240MIN. Al ser valores porcentuales, el contenido de ELN puede ser un efecto dado por el descenso en el contenido de los demás nutrientes (proteína, lípidos, cenizas).

Si se observan los niveles de carbohidratos de las dietas experimentales (Cuadro 3), cuyos valores fueron de entre el 18 y 22% del peso seco, éstos pudieron ser altos en comparación con el nivel de tolerancia de entre 10 y 15% reportado para juveniles de pez blanco, por Canseco-Murillo (2008). Al relacionar estos niveles de carbohidratos con el contenido de lípidos en el cuerpo de los peces finales de todos los tratamientos (Cuadro 6), se puede deducir que al cubrir el requerimiento energético de los peces, el exceso de carbohidratos de las dietas podría estar siendo almacenado en forma de lípidos corporales, como ocurre en otras especies de peces (Chiou y Ogino 1975, Degani y Levanon 1987) ya que estos organismos no almacenan los carbohidratos en forma de glucógeno, sino más bien de forma anhidra (Jobling 1994).

## Conclusiones.

- El mejor crecimiento de juveniles del pez blanco se obtuvo con las dietas de bagre armado que incluía el producto sin hidrolizar (NOH), y con los hidrolizados de 15 (H15MIN) y 60 minutos (H60MIN), a diferencia de las dietas TESTIGO a base de hidrolizado comercial y la dieta de bagre armado de 240 minutos de hidrólisis (H240MIN), las cuales produjeron un menor crecimiento, es decir con proteínas aun no muy degradadas, o proteínas de origen comercial que no indican el método utilizado para su obtención y que posiblemente algún ingrediente provoque la reducción del crecimiento.
- El proceso de hidrólisis proteínica no favoreció un mejor crecimiento de los juveniles de pez blanco, lo que resulta aun más favorable porque minimiza los costos de producción del alimento y facilita su preparación.
- Las dietas conteniendo bagre armado (*P. disjunctivus*) produjeron el más importante crecimiento logrado hasta el momento con dietas balanceadas en el pez blanco (*M. estor*).
- El resultado favorable en el crecimiento del pez blanco, por la inclusión de bagre armado, abre una excelente alternativa de empleo de este recurso pesquero, además de que potencialmente puede utilizarse en otros organismos acuáticos.
- El uso del bagre armado en dietas para la acuicultura, constituye una excelente opción para su control y aprovechamiento, siendo éste un recurso pesquero abundante y de bajo costo en la región, que ha generado diversas problemáticas asociadas a su abundante presencia en las presas del país.



## Literatura citada.

AOAC 2000. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists. 17 th ed. Washington, EUA. 1018p.

Anders, A., Britt, H., Øistein, H. y Sissel A. 2006. **Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua***. Aquaculture. 261: 1102-1110.

Belén-Camacho, D. R., Moreno-Álvarez, M.J., García, D., Medina, C. y A. Sidrovas. 2007. **Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez caribe colorado (*Pygocentrus cariba* Humboldt, 1821)**. Interciencia. 32 (3): 188-194.

Berge, G.E., Lied, E., Espe, M. 1994. **Absorption and incorporation of dietary free and protein bound (U14C)-lysine in Atlantic cod (*Gadus morhua*)**. Comp. Biochem. Physiol. 109A: 681-688.

Berge, G. M. y T. Storebakken. 1996. **Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry**. Aquaculture. 145: 205-212.

Bradford M. M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal Biochem. 2:248-254.

Brown M. E. 1987. **Experimental studies on growth**. En: Brown M. E. (Ed.) **The Physiology of fishes**. Academic Press, New York. pp. 361.

Cahu, C.L. y Zambonino Infante, J.L. 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. y Zambonino I. J. 1995a. **Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases**. Fish Biochem. Physiol. 14: 209-214.

Cahu, C.L. y Zambonino-Infante J. 1995b. **Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources**. Fish Physiol. Biochem. 14(6): 431-437.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M. M. 1999. **Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae**. Aquaculture 171: 109-119.

Cahu, C. y Zambonino, I. J. 2001. **Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae**. Aquaculture. 200: 161-180

Cahu, C., Rønstad, I., Grangier, V., Zambonino Infante, J. L. 2004. **Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in**

**relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin.** Aquaculture. 238: 295-308.

Canseco-Murillo L. W. 2008. **Efecto del nivel de carbohidratos en la dieta sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de pez blanco (*Menidia estor*).** Tesis de licenciatura. UMSNH. Morelia, Michoacán.

Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. 17 y 28 de agosto 2002.

Carvalho, A.P., Escaffre, A.-M., Oliva Teles, A., Bergot, P. 1997. **First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates.** Aquac. Int. 5: 361-367.

Carvalho, A.P., Sa´ R., Oliva-Teles, A. y P. Bergot. 2004. **Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages.** Aquaculture 234: 319 – 333.

Chiou, J.Y. y C. Ogino. 1975. **Digestibility of Starch in Carp.** Bull. Jap. Sci. Fish 41: 465-466.

Cowey C.B., Adron J.W., Brown, D.A. y A.M. Shanks. 1975. **Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice *Pleuronectes platessa* and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice.** British Journal of Nutrition. 33: 219-231.

Cowey, C.B. 1995. **Protein and amino acid requirements - a critique of methods.** J. Appl. Ichthyol. 11, 199– 204.

Degani, G. y D. Levanon. 1987. **Effects of dietary carbohydrates and temperatures on slow growing juvenile eels *Anguilla Anguilla*.** Env. Biol. of Fishes. 18(2): 149-154.

Espe, M. y E. Lied. 1994. **Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis?** Comp. Biochem. Physiol. 107A, 249– 254.

Guadix, A., Guadix, E.M., Páezdueñas, M.P., González-Tello, P. y Camacho, F. 2000. **Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas.** Ars. Pharm. 41: 79-89.

Harfush, M.M.R. 1992. **Determinación de los requerimientos de proteína dietaria en crías de *Cichlasoma urophthalmus* (Günter 1862) alimentadas *ad libitum*.** Tesis de Maestría CINVESTAB-IPN. Unidad Mérida. 67pp.

Hevrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M. y G. I. Hemre. 2005. **Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth.** Aquaculture Nutr. 11: 301–313.

Jobling M. 1994. **Nutrient interactions and fish health.** En: Jobling M. (Ed.) **Fish Bioenergetics.** Chapman & Hall. London. pp 77-86.

Kolkovski, S. y A. Tandler. 2000. **The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae.** Aquac. Nutr. 6: 11– 17.

Kolkovski S. 2001. **Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets.** Aquaculture. 200: 181-200.

Kristinsson, H.G. y B.A. Rasco. 2000. **Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties.** Crit. Rev. Food Sci. Nutri. 40: 43-81.

Laemmli U.K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 227: 680-685.

Lazo J. 2000a. **Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos.** In: 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, México.

Marez, B.L.G y J.J.Morales. 2003. **Contribución al estudio del cultivo del pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el Centro Regional de Investigación Pesquera de Pátzcuaro, Michoacán.** En: Rojas Carrillo, P. (Ed.) Historia y Avances del cultivo de pescado blanco. SAGARPA-INP.

Martínez-Palacios, C. A., Ríos-Durán, M.G., Campos Mendoza, A., Toledo Cuevas, M., Aguilar-Valdez, M.C. y L.G. Ross., 2002. **Progresos en el cultivo del Pescado Blanco del Lago de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*.** Ciencia Nicolaita. 32: 73-90.

Martínez-Palacios, C. A., Comas Morte, J., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M. y L.G. Ross. 2004. **The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1879. (Pisces: Atherinidae).** Aquaculture. 238: 509-522.

Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Fonseca-Madrigal, J., Toledo-Cuevas, E.M., Sotelo-López, A. y L.G. Ross. 2008. **Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880.** Aquaculture Research. 39: 738-747.

Martínez-Palacios, C.A., Ross, L.G., Arreguín-Sánchez, F., Campos M.A., Díaz Pardo, E., Fonseca M.J., Gutiérrez H.A., Pacheco A.R., Ramírez-Suarez, J.C., Ríos-Durán, M.G., Rueda, J.R., Toledo, C.E.M., Salas, R.G., Shimada, A., Viana, C. Ma.T., Sánchez Ch.A. y E. Avila González. 2010. **Los Peces Diablo, especies invasoras: Una mejor visión y mas objetiva del problema después de tres años de intenso trabajo de Investigación en biotecnología.** Biodiversitas (enviado).

Medina-Reyna, C.E., Chávez-Sánchez, M.C. y Martínez-Palacios, C.A. 2000. **Evaluation of a Microbound Spray-Dried Feed for the Rearing of Penaeid Shrimp Larvae.** Journal of Aquaculture. 62: 73-77.

Moon Lee, HaeYoung., Cho, Kee-Chae., Lee, Jeong-Eui y Yang, Sang-Geun. 2001. **Dietary protein requirement of juvenile giant croaker, *Nibea japonica* Temminck & Schlegel.** Aquaculture Research. 32: 112-118.

Ríos-Durán M.G. 2007. **Efectos de la vitamina C sobre la reproducción, crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés en el pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor* (Jordan 1880)**. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México, D.F. 167pp

Rojas-García, C.R. y Rønnestad I. 2002. **Cholecystokinin and tryptic activity in the gut and body of developing Atlantic halibut larvae: evidence for participation in the regulation of protein digestion**. Journal of Fish Biology. 61: 973–986.

Rønnestad, I., Thorsen, A., 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., Conceicao, L.E.C., Aragao, C., Dinis, M.T. 2000. **Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*)**. J. Nutr. 130: 2809–2812.

Rønnestad, I., Rojas-García, C.R., Tonheim, S.K., Conceicao, L.E.C. 2001. **In vivo studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae**. Aquaculture. 201: 161-175.

Rønnestad I. 2002. **Control and efficiency of digestive function of marine fish larvae**. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Ed.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3-6 Sep. 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn H.J., Rojas-García, C.R. Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F. Barr, Y. y L.E.C. Conceicao. 2003. **The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings**. Aquaculture. 227: 147-164

Ross, L.G., Martínez-Palacios. C.A., Aguilar Valdez, Ma. del C., Beveridge, M.C.M. and Chávez Sánchez, Ma. C. 2006. **Determination of feeding mode in fishes: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880**. Journal of Fish Biology. 68: 1782-1794.

Ross, L.G., Sánchez-Blanco, J., Martínez-Palacios, C. Racotta, I.S. y M. Toledo-Cuevas. 2007. **Anaesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and hypothermia**. Aquaculture Research. 38: 909-917.

Savoie, A., Le François, N.R., Cahu, C., Blier, P.U., y Andreassen, I. 2006. **Do protein hydrolysates improve survival and growth of newly-hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor*), a non-metamorphic aquaculture fish species?** Aquaculture. 261:782-788.

Silk, D.B.A., Grimble, G.K., y Rees, R.G. 1985. **Protein digestion and aminoacid and peptide absorption**. Proc. Nutr. Soc. 44: 63-72.

Toledo-Cuevas E.M., Tenorio-Patiño C., Herrera-Vargas M.A., Álvarez-González CA., Tovar-Ramírez D., Moyano-López, FJ., Ríos-Durán MG., Bolasina S., Martínez-Palacios CA. 2007 **Actividad enzimática digestiva del pez blanco de Pátzcuaro, *Menidia estor*, durante**

**su desarrollo ontogénico larvario.** Memorias del 3er Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. 377-381p. Morelia, Michoacán, 4 de Octubre del 2007.

Walford, J., Lim, T.M., T.J. Lam. 1991. **Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of sea bass *Lates calcarifer* larvae: do they ingest and digest protein-membrane microcapsules?** Aquaculture 92: 225–235.

Wee K.L. 1992. **An over view of fish digestive physiology and the relevance to the formulation of artificial fish feeds.** Proc. Aqua. Nutr. Workshop. Allan, G.L., Dall, W. (Eds.) Salamander-Bay, NSW-Australia NSW-Fisheries 1992.

Zambonino, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., 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 Cahu C.L. 2001. **Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae.** Comp. Biochem. Physiol. 130: 477-487.

Zarate, D.D., Lovell, R.T., Payne, M. 1999. **Effects of feeding frequency and rate of stomach evacuation on utilization of dietary free and protein-bound lysine for growth by channel catfish *Ictalurus punctatus*.** Aquac. Nutr. 5: 17-22.

## VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- A pesar de que las dietas con inclusión de bagre armado hidrolizado (*P. disjunctivus*) no produjeron el resultado esperado en juveniles de pez blanco (*M. estor*), es de interés examinar en futuros estudios si estas dietas tienen un efecto positivo durante la etapa larvaria de esta especie.
- Sería importante cuantificar los aminoácidos y péptidos, resultantes de los procesos de hidrólisis, así como determinar el tamaño molecular de los péptidos para un mejor entendimiento de su efecto en el crecimiento de los organismos.
- Del mismo modo debe cuantificarse el material lixiviado durante el proceso de alimentación de los organismos acuáticos con las dietas preparadas.
- Debe buscarse mejorar la técnica y el proceso de elaboración de las dietas para evitar lixiviación de nutrientes.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Avalos S.A.M. 2006. **Digestibilidad *in vitro* de dietas con diferentes combinaciones de ligantes diseñadas para larvas y juveniles de pez blanco del lago de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor* (Jordán 1879).** Tesis profesional. Facultad de Biología. U.M.S.N.H. México. 52p.

Aurrekoetxea, G. y Perera, M. N. 2001. **Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura.** Revista AquaTIC. No.13.<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=105> (Noviembre 2009).

Bello R. 1994. **Experiencia con ensilado de pescado en Venezuela.** En: Taller “Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios de la ganadería”. FAO. La Habana, Cuba. 5-8 sep. <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap1.htm>. (Marzo 2009).

Barbour C.D. 1973. **The systematics and evolution of the genus *Chirostoma swainson* (Pisces: Atherinidae).** Tulane Studies in Zoology and Botany. 18(3): 97-141.

Cahu, C.L. y Zambonino-Infante, J.L. 1997. **Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?** Aquacult. Int. 5:151-160.

Campos, M.A., Martínez-Palacios, C.A. y L.G. Ross. 2009. **Cultivo de *Chirostoma estor estor*, un pez de importancia comercial.** En: Lascrain, M., List, R., Barraza, L., Díaz-Pardo, E., Sill, F.G., Maunder, M., Dorantes, J. y V.E. Luna. (Ed.). **Conservación de peces ex situ, en Capital natural de México. Vol. II. Estado de conservación y tendencias de cambio.** CONABIO, México. pp. 517-544.

Castillo S. J. J. 1990. **Producción y caracterización de un concentrado de proteínas foliares a partir de ramié (*Bohemeris nivea*).** Fac. de Ingeniería. Universidad de San Carlos. Guatemala.

Clemente A. 2000. **Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition.** Trens in food. Science and Technology. 11:254-262.

Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Marín-Saldivar, L.F., Guajardo-Barbosa, C., Nieto-López, M., y Salinas- Miller, A. 2002. **Historia y estatus actual de la digestibilidad y algunas características fisicoquímicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México.** Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.

Diaz, M., Moyano, F.J., García-Carreño, F.L., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C. 1997. **Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream.** Aquaculture. Int., 5,461-471.

Dillanes G.M. 2001. **Las pesquerías continentales (la pesca en México): ante un mar de problemas una red de soluciones.** Ecología. México D.F. 12-18.



Diniz, F.M. y Martin, A.M. 1997. **Fish protein hydrolysates by enzymatic processing.** Agro-Food-Industry Hi-Tech. May-Jun, pp 9-13.

Dyer, B.S., Chernoff, B., 1996. **Phylogenetic-relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomorpha).** Zool. Journal Society. 69p.

Fyhn, H.J., 1989. **First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy?** Aquaculture. 80: 111–120.

Food Agriculture Organization. 2009. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008.** Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma 2009. ISSN 1020-5500.

García-Carreño, F. L., Navarrete del T, M. A., Hernández- Cortés, P., Ezquerra, J. M., Serviere, E., Maeda, A., 2002. **Tecnología enzimática en acuicultura. Avances en nutrición acuícola** (Memorias).

Hoyle, N.T. y Merrit, J.H. 1994. **Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*).** Journal of Food Science. 59 (1): 76-79.

Lazo, J.P., Holt, G.J., Arnold, C.R. 2000b. **Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*).** Aquaculture Nutrition. 6:183-192.

Liddle R.A. 1995. **Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors.** Am. J. Physiol. 269G: 319–G327.

Martínez-Palacios, C. A., Toledo Cuevas, M., Racotta- Dimitrov, E., Ríos–Durán, M.G., Palacios-Metchernov, E., Fonseca-Madrugal, J., Campos Mendoza, A., y L.G. Ross., 2006. **Aspectos nutricionales del pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1879).** Avances en Nutrición Acuícola. 15-17 de Nov. UANL. Monterrey, México. ISBN 970-694-333-5.

Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Ambriz-Cervantes, L. Jauncey, K. J. y L.G. Ross. 2007. **Dietary protein requeriment of juvenile Mexican Silverside (*Menidia estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktrophagus fish.** Aquaculture Nutrition. 13: 304-310.

Martínez-Palacios C.A. 2009. **Desarrollo tecnológico para el aprovechamiento e industrialización del pez diablo en la región del Balsas en Michoacán.** Informe final Proyecto FOMIX 37147. Septiembre 2006-Febrero 2009. Mayo 2009.

Mendoza, R., Contreras, R., Ramírez, C., Koleff, P., Álvarez, P. y V. Aguilar. 2007. **Los peces diablo: especies invasoras de alto impacto.** Biodiversitas. Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Núm. 70. Enero-Febrero de 2007. ISSN: 1870-1760.

Miller, R.R., Minckley, W.L. y S.M. Norris. 2005. **Freshwater Fishes of Mexico.** Museum of Zoology, University of Michigan. 652p.



Pimentel-Acosta C. A. 2009. **Uso del Bagre Armado (*Pterigoplichthys disjunctivus*) en ensilado ácido como fuente de proteína alterna en dietas para el cultivo de pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*)**. Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. UMSNH. Morelia, Mich. México. 41pp.

Pineda-Delgado D. 2010. **Efecto de la salinidad en la capacidad de síntesis de ácidos grasos en hepatocitos y enterocitos del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)**. Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. UMSNH. Morelia, Mich. 37p.

Prieto V.C.A. 2007. **Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas**. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.

Quaglia, G.B. y Orban, E. 1987. **Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases**. Journal of Science Food Agriculture. 38: 263-269.

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.

Rust M.B. 1995. **Quantitative aspects of nutrient assimilation in six species of fish larvae**. PhD thesis. University of Washington, USA.

Sampedro, G., López-Benito, M. y Pastoriza, L. 1986. **Cabezas y vísceras de túnidos: Su aprovechamiento para alimentación animal**. Informe técnico N° 137 del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Barcelona.

Spannhof, L. y H. Plantikow. 1983. **Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout**. Aquaculture 30: 95-108.

Tacon A.G.J., 1989. **Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados**. Manual de capacitación. Programa cooperativo gubernamental FAO, Proyecto Aquila II, Documento de campo No. 4. México. Pp 1-502.

Yamamoto, S., Sakamoto, S. and Takeuchi, M. 2002. **Estimation of protein sources and effects of water-soluble nitrogen components in artificial diets on larval ayu**. Nippon Suisan Gakkaishi. 68(3): 327-333.