UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS MARINAS Y PESQUERÍAS
DOCTORADO EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS

FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LARVAS Y JUVENILES DE SARGO

***Archosargus probatocephalus* (PERCIFORMES: SPARIDAE)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

Doctor en Ecología y Pesquerías

PRESENTA:

M.C María de la Luz Merino Contreras

BOCA DEL RÍO, VER. OCTUBRE 2018

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS MARINAS Y PESQUERÍAS
DOCTORADO EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS

FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LARVAS Y JUVENILES DE SARGO *Archosargus probatocephalus* (PERCIFORMES: SPARIDAE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

Doctor en Ecología y Pesquerías

PRESENTA:

M.C María de la Luz Merino Contreras

Comité tutoral:

Dra. Ma. de Lourdes Jiménez Badillo (Directora)
Dr. Carlos Alfonso Álvarez González (Co-director)
Dr. César Gabriel Meiners Mandujano (Asesor)
Dr. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi (Asesor)
Dra. Ma. Piedad Sánchez Morillo-Velarde (Asesor)

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a mi amada familia, la directa y la extendida, en particular a mis papás, hermanos y sobrinos.

Muy especialmente a mis adorados hijos: Froylán y Emiliano, que son el motor que me mueve a alcanzar nuevas metas, que me permiten crecer cada día.

A mi amado oso Froy, compañero de viaje en esta vida, gracias por compartir esta aventura, por tu apoyo incondicional, ya que sin el, difícilmente lo hubiera logrado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Tecnológico Nacional de México, por la licencia de beca comisión otorgada para realizar estudios de posgrado de alta calidad. Así mismo, agradezco al PRODEP la beca convencional Nacional otorgada para estudios de doctorado No. DSA/103/14/5375, ambas becas me permitierón realizar mi doctorado en este Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías de la UV.

Les doy las gracias por todo lo que enseñaron a mis maestros del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías, en especial a mi comité tutoral: a mi director Dr. Carlos Alfonso Álvarez González (UJAT), gracias Poncho por tu amistad y tu apoyo incondicional, sin él no hubiera sido posible llevar a buen puerto este barco. A mi directora: Dra. Ma. de Lourdes Jiménez Badillo, gracias Lourdes por confiar en mí y brindarme tu amistad, así como, tu atinada dirección. A mis asesores: Dr. César Gabriel Meiners Mandujano, Dr. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi y Dra. Ma. Piedad Sánchez Morillo-Velarde, por sus observaciones y comentarios, que enriquecieron mi aprendizaje. Tambien agradezco a mi comité de examen general de conocimientos: Dra. Gabriela Galindo Cortés, Dr. Horacio Pérez España y Dra. Patricia Arceo, por sus aportaciones y señalamientos que enriquecieron mi desempeño.

Les doy las gracias especialmente a mis lectores: Dr. Alberto Asiain Hoyos y Dr. Mario Garduño Lugo, por sus acertados comentarios y señalamientos, que permitieron el enriquecimiento de mi trabajo de tesis.

A mi compañero y amigo José Francisco Rendón, Magdali y Melani por el apoyo brindado en la captura de los sarguitos y el acondicionamiento del sistema.

A mi querido amigo M.C. Alejandro Morales García por su apoyo en el procesamiento de datos.

Agradezco también al Dr. Emir S. Peña Marín, por su valiosa participación en la revisión de los articulos publicados y su apoyo durante mis estancias en la UJAT.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera, contribuyeron en la realización de la presente tesis, gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO Página

INTRODUCCIÓN……..... 1

CAPÍTULO 1 ACLIMATACIÓN Y REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO DE SARGO (*Archosargus probatocephalus*)

1.1 Resumen…….. 8
1.2 Introducción…… 9
1.3 Material y métodos…….. 10
1.3.1 Lote madurado sexualmente en cautiverio……. 10
1.3.2 Lote de organismos silvestres…… 11
1.3.3 Manejo de reproductores y huevos…… 12
1.3.4 Manejo de larvas……..... 12
1.3.5 Análisis estadístico……..... 13
1.4 Resultados……..... 13
1.4.1 Desove de organismos madurados en cautiverio…….. 13
1.4.2 Desove de organismos silvestres……... 15
1.4.3 Descripción de eleuteroembriones y larvas……... 17
1.5 Discusión……..... 19

CAPÍTULO 2 DESCRIPCIÓN MORFO-FUNCIONAL DEL TRACTO DIGESTIVO DURANTE LA ONTOGENIA INICIAL DE LARVAS

2.1 Resumen……..... 23
2.2 Introducción……..... 23
2.3 Material y métodos……..... 26
2.3.1 Obtención de larvas y toma de muestras…… 26
2.3.2 Procesamiento histológico……..... 26
2.3.3 Actividad enzimática digestiva…….. 27
2.3.4 Análisis estadístico……..... 28
2.4 Resultados……..... 28
2.4.1 Descripción histológica……..... 28
2.4.2 Actividad enzimática digestiva de larvas…….. 35
2.5 Discusión……..... 37

CAPÍTULO 3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE JUVENILES

3.1 Resumen……..... 40
3.2 Introducción……..... 41
3.3 Material y métodos……..... 45
3.3.1 Preparación de extractos multienzimáticos…… 45
3.3.2 Análisis de la actividad enzimática digestiva……. 45

3.3.3 Efecto del pH y la temperatura en las proteasas digestivas… 47
3.3.4 Efecto de inhibidores en la actividad de las proteasas…….. 47
3.3.5 Análisis de zimogramas…… 48
3.3.6 Análisis del grado de hidrólisis…….. 49
3.3.7 Análisis de aminoácidos totales libres……... 51
3.3.8 Análisis estadístico……. 51
3.4 Resultados……..... 52
3.4.1 Actividad enzimática digestiva……. 52
3.4.2 Caracterización parcial de proteasas……. 53
3.4.3 Digestibilidad *in vitro*……..... 56
3.4.4 Aminoácidos totales libres…..……. 58
3.5 Discusión……..... 59

CAPÍTULO 4 REQUERIMIENTOS DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN JUVENILES

4.1 Resumen……..... 65
4.2 Introducción……..... 66
4.3 Material y métodos……..... 68
4.3.1 Evaluación de dietas con diferentes niveles de proteína…… 68
4.3.2 Evaluación de dietas con diferentes niveles de lípidos…….. 70
4.3.3 Variables de crecimiento y eficiencia alimenticia…….. 72
4.3.4 Análisis estadístico……..... 73
4.4 Resultados……..... 74
4.4.1 Efecto de dietas con diferentes niveles de proteína …….. 74
4.4.2 Efecto de dietas con diferentes niveles de lípidos ……..... 76
4.5 Discusión……..…….. 79

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES…….…….. 84

REFERENCIAS…….…….. 88

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 **Pág.**

Fig. 1 Peso promedio (g) y longitud furcal promedio (cm) registrados en sargos *(A. probatocephalus)* acondicionados al cautiverio por un año……..…….. 13

Fig. 2 Microfotografías de diferentes estadios de maduración sexual de ovocitos de sargo…….… 15

Fig. 3 Principales cambios morfológicos registrados en la ontogenia inicial de larvas de sargo (*A. probatocephalus*)……..…….... 18

CAPÍTULO 2

Fig. 1 Microfotografía de eleuteroembrión de *A. probatocephalus* de un día después de la eclosión..…….…….... 30

Fig. 2 Microfotografía de eleuteroembrión de *A. probatocephalus* de dos días después de la eclosión……... 30

Fig. 3 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de tres días despúes de la eclosión……...…… 31

Fig. 4 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de cuatro días despúes de la eclosión……. 31

Fig. 5 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de siete días despúes de la eclosión. ……... 32

Fig. 6 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de nueve días despúes de la eclosión……. 32

Fig. 7 Microfotografía de parte anterior de la cavidad bucofaríngea de larvas de sargo 33

Fig. 8 Microfotografía de esófago y estómago funcionales…….…… 33

Fig. 9 Microfotografía de glándulas accesorias de larvas de sargo ……..……... 34

Fig. 10 Microfotografía del intestino anterior (ia) y posterior (ip)…….. 34

Fig. 11 Actividades enzimáticas digestivas específicas durante la ontogenia inicial del sargo *A. probatocephalus*…… 35

CAPÍTULO 3

Fig. 1 Efecto del pH en las proteasas digestivas de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*)……. 52

Fig. 2 Efecto de la temperatura en las proteasas digestivas de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*)……. 53

Fig. 3 Efecto en la reducción de la actividad de las proteasas digestivas en extractos multienzimáticos de juveniles de *A. probatocephalus* con diferentes inhibidores…….. 54

Fig. 4 Zimograma de proteasas ácidas a partir de extractos multienzimáticos de *A. probatocephalus*……... 55

Fig. 5 Zimograma en SDS-PAGE de proteasas alcalinas de juveniles de *A. probatocephalus*……...… 55

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1 **Pág**.

Tabla 1. Características de los desoves, huevos y larvas de sargo (*A. probatocephalus*) obtenidos de reproductores madurados sexualmente en cautiverio y silvestres…….. 16

Tabla 2. Longitud de la notocorda (LN) registrada durante la ontogenia inicial de sargo *(*A. *probatocephalus*)……..…… 18

CAPÍTULO 3

Tabla 1. Actividades de enzimas digestivas registradas en extractos multienzimáticos de estómago e intestino de juveniles de sargo…….…… 52

Tabla 2. Valores de grado de hidrólisis (GH) y digestibilidad en vitro (%) de diferentes harinas…….…… 58

Tabla 3. Valores de aminoácidos totales libres……..……..……..…… 59

CAPÍTULO 4

Tabla 1 Ingredientes y composición proximal de dietas empleadas para determinar el efecto de dietas con diferentes niveles de proteína en crías de sargo *A. probatocephalu*….. 69

Tabla 2. Ingredientes y composición proximal de dietas empleadas para determinar el efecto de diferentes niveles de lípidos en juveniles de sargo *A. probatocephalus*……..… 71

Tabla 3. Peso y longitud total de crías de sargo (*A. probatocephalus*) alimentados por 100 días con dietas con diferentes niveles de proteína…….……..… 74

Tabla 4. Variables de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia de crías de sargo (*A. probatocephalus*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de proteína……. 75

Tabla 5. Composición bioquímica (% de materia seca, excepto humedad) de todo el cuerpo de juveniles de sargo alimentados con dietas con diferentes niveles de proteína….. 76

Tabla 6 Peso húmedo (g) y longitud total (cm) promedio de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*) alimentados 100 días con dietas con diferentes niveles de lípidos…..…. 77

Tabla 7 Variables de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia de juveniles de

sargo (*A. probatocephalus*) alimentados con dietas con diferentes niveles de lípidos……...…….. 78

Tabla 8. Composición bioquímica (% de materia seca, excepto humedad) de todo el cuerpo de juveniles de sargo alimentados con dietas con diferentes niveles de lípidos…….. 79

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales aspectos a considerar en la producción acuícola es la alimentación, ya que este rubro representa en ocasiones más del 60 % del costo de producción. Para alimentar de manera eficaz a los organismos, es necesario realizar estudios sobre la nutrición de organismos acuáticos, en particular los aspectos de fisiología digestiva, si se pretende que la acuacultura sea rentable (Tacon, 1993). El éxito de los cultivos comerciales estriba en desarrollar dietas de bajo costo, que cubran los requerimientos de la especie (Lan & Pan, 1993), que permitan un buen crecimiento, una adecuada eficiencia alimenticia y supervivencia, y que además, reduzcan la contaminación ambiental (NRC, 2011).

Las dietas deben cubrir los requerimientos nutricionales específicos, en cuanto a proteínas, lípidos y carbohidratos, en cada etapa del desarrollo (Kim *et al.,* 2002). En la elaboración de dietas artificiales, la proteína es el nutriente más importante, constituye el componente mayor, y usualmente es el ingrediente más costoso (Yang & Liu 2002; Luo *et al*., 2004), no solo provee de aminoácidos para la síntesis de proteína, si no también son usadas en la reparación de tejidos, crecimiento y como fuente de energía (Jones *et al*., 1996; Yang *et al*., 2002; Luo *et al*., 2004). El valor nutricional de una proteína depende de su composición y su proporción en aminoácidos, la que debe ser necesaria para satisfacer la demanda del pez (Jones *et al*., 1996). Otro elemento igualmente importante y costoso son los lípidos, que se utilizan principalmente como fuente de energía (Dong *et al*., 2014), aportan ácidos grasos poliinsaturados esenciales para la supervivencia y crecimiento normal de los organismos, ya que forman parte estructural de la membrana celular y de otros organelos (Rosenlund *et al*., 2001; Mateen *et al*., 2016). Son una fuente de energía concentrada digestible, transportadores de vitaminas liposolubles A, E, D y K. Particularmente importantes para los peces, ya que funcionan como reserva energética, requeridos en actividades de alta demanda energética, como la reproducción y migración (Dong *et al.,* 2014).

Los carbohidratos son una excelente fuente de energía en las formulaciones de alimentos, aunque no son estrictamente esenciales, la inclusión óptima de carbohidratos en las dietas de los peces en cultivo, aumenta la retención de proteínas y lípidos, y reduce la descarga de nitrógeno en los

efluentes de las granjas (Tacon, 1993). Su presencia en la mezcla de ingredientes durante el proceso de cocción y extrusión, ayuda en la unión, la estabilidad y la flotabilidad del pellet (Tacon, 1995).

Con base en la estructura del aparato digestivo, los peces se pueden dividir en dos grandes grupos: el primero, que son los peces agastros (que no cuenta con estómago), que pasan el alimento del esófago al intestino directamente, realizando solamente una digestión intestinal, donde se lleva a cabo una adsorción pinocítica de proteínas, parcialmente digeridas por las células epiteliales del intestino; este tipo de peces son generalmente omnívoros, con tendencia al herbívorismo. El segundo grupo incluye los peces que poseen estómago, que le permite mejorar la eficiencia de adsorción de los nutrientes, debido a una predigestión ácida, y del aumento de la superficie de adsorción del canal alimenticio (Sunde, 2006). En estos organismos la hidrolisis de la proteína presenta dos fases; la primera la fase ácida, la que se desarrolla en el estómago, donde tiene lugar la acción de las proteasas gástricas tipo pepsinas. La segunda fase es la alcalina, que se desarrolla en el intestino, donde las enzimas proteolíticas son principalmente: tripsina, quimotripsina y algunas metaloproteasas.

Para entender el proceso digestivo es necesario poner de manifiesto el papel que juegan las enzimas; estas son catalizadores biológicos que aceleran una reacción química, sin alteraciones de ellas en el proceso. La acción enzimática puede ser influenciada por factores intrínsecos como: la especie, el estado de desarrollo, el estado fisiológico, y los factores extrínsecos como: la temperatura, la cantidad y composición del alimento y factores antinutricionales como: algunas antiproteasas y antiamilasas (Álvarez-González *et al*., 2001; De Silva *et al*., 2006).

La mayor parte de los catalizadores químicos o enzimas son proteínas y se clasifican en seis grandes grupos según la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica (Mathews & Van Holde, 1998): Oxido reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas; siendo las hidrolasas las encargadas de catalizar rupturas hidrolíticas. En el caso de las hidrolasas digestivas se dividen en los siguientes grupos con base al nutriente que hidrolizan: proteasas (digestión de proteínas), grupo compuesto por tripsina, quimiotripsina, pepsina, carboxipeptidasa, etc., amilasas (catalizan la hidrólisis de almidón y glucógeno), lipasas

(hidrólisis de ácidos grasos) y fosfatasas (actúan en la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico) (Lehninger, 1995).

La capacidad digestiva de los organismos se relaciona directamente con la disposición de enzimas digestivas, necesarias para la hidrólisis de un alimento (Pedersen & Eggum, 1983). Con base en lo anterior, el análisis de las enzimas puede utilizarse para determinar las condiciones nutricionales de los peces en etapas tempranas del desarrollo. La funcionalidad de la batería enzimática digestiva de cualquier especie acuática es el resultado de un proceso evolutivo, en donde el principal factor de selección ha sido el régimen alimenticio, donde generalmente, participan la composición de los alimentos ingeridos, así como las pautas de alimentación de la especie (Moyano, 2006).

La especie objeto de estudio de la presente investigación es el sargo *Archosargus probatocephalus*, (Walbaum, 1792), que es un pez marino costero subtropical que ingresa a aguas salobres, se distribuye en las costas del Océano Atlántico occidental (Bester & Robins 2005), desde Nueva Escocia en Canadá hasta el Golfo de México, con registros en Honduras y sur de Brasil, ausente en las islas caribeñas (GSMFC, 2006). Es un componente importante de las pesquerías comerciales y recreativas-deportivas a lo largo de la costa Atlántica de EUA (Figueira & Coleman 2010). En EUA presenta importancia comercial, aunque no es una especie objetivo de la pesca, e históricamente ha sido considerada como captura incidental en la pesca de arrastre de camarón y de otras especies, en operaciones de palangre en alta mar (NMFS, 2006). Es más importante como especie de pesca deportiva-recreativa ya que ocupa el octavo lugar en esta actividad (Lellis-Dibble *et al.,* 2008; McDonough *et al*., 2011).

En México este recurso no constituye una especie objetivo de la pesca, sin embargo, se considera dentro de las especies de interés comercial del Golfo de México, ya que se captura en la pesca artesanal multiespecífica, reportada ecológicamente asociada a la pesquería de jurel (*Caranx hippos*) y cojinuda (*C. chrysos*), con las que conforma para su aprovechamiento comercial, un grupo funcional vulnerable al mismo arte de pesca (Álvarez-Vela, 2009). En el contexto nacional en los años 2006 al 2013, el estado de Veracruz aportó en promedio el 61 % de las capturas de sargo (CONAPESCA-SAGARPA, 2015).

En el 2012 se consideró al sargo como una especie viable para el desarrollo de la maricultura en la región, dentro del Programa Nacional de la Red Nacional de Investigación e Información en Pesca y Acuacultura RIINIPA-INAPESCA (2012). Tucker (1998, 2004) la considera una especie con potencial en acuacultura, ya que presenta una buena adaptabilidad al cautiverio, tiene un amplio espectro de alimentación, soporta bien las condiciones de hacinamiento que se presentan en los cultivos, y se han producido crías en laboratorio (Tucker & Barbera, 1987; Tuker 1998, 2004; Basurto & Cruz, 2000).

Se sabe que, el sargo es una especie de rápido crecimiento en el inicio de su desarrollo, ya que alcanza la talla comercial en el primer año de edad, puede llegar a pesar más de 14 kg y alcanzar una longitud máxima de 80 cm y su carne blanca es de excelente calidad (Beckman *et al.,* 1991; Tucker, 1998, 2004). Presenta una adecuada aceptación en el mercado estatal y nacional, alcanzando un valor de $ 80.00 por Kg (mercados locales). Posee un enorme potencial socioeconómico, siendo una alternativa en la producción de peces marinos, produciendo proteína de alta calidad a bajo costo, para la población en general, generando así mismo fuentes de empleo (Tucker, 2004; Ávarez-Vela, 2009).

A. probatocephalus pertenece a la familia Sparidae, que es una de las más cultivadas en el mundo, con representantes tan importantes como la brema roja (*Pagrus major)* en Japón y Taiwan (Okuzawa, 2015) y la dorada *(Sparus aurata)* en el Mediterráneo (APROMAR, 2017). Ambas especies son carnívoras, por lo que requieren altas cantidades de proteína de origen animal (18.8 %) en sus alimentos, para alcanzar óptimos crecimientos en cautiverio. Lo que no ocurre con el sargo que presenta una estrategia trófica omnívora (Sedberry, 1987), razón por la que se espera, que sus requerimientos proteicos sean menores, lo que reducirá considerablemente sus costos de producción, presentando esto una ventaja competitiva.

Se sabe que, para la elaboración de dietas practicas, es importante considerar lo consumido por la especie en su medio natural, en este sentido cabe señalar que, la dieta de las larvas de sargo se compone principalmente de zooplancton: copépodos y anfípodos. Los juveniles consumen principalmente ostrácodos, gammáridos, misidáceos, copépodos, gusanos poliquetos y briozoos

(Springer & Woodburn 1960; Sedberry, 1987) y los de mayor talla se alimentan de organismos de caparazón duro como crustáceos, moluscos bivalvos, braquiuros, equinodermos, percebes, y de pequeños peces (Jennings, 1985). Los adultos se alimentan principalmente de invertebrados y algas (Ogburn, 1984; Castillo–Rivera *et al.*, 2007).

Otros estudios han mostrado que, la capacidad de consumir material vegetal por *A. probatocephalus*, se relaciona con adaptaciones morfológicas en la dentición y en su longitud relativa intestinal promedio, que es de 128 % (Castillo–Rivera *et al*., 2007). Así mismo, cuenta con dientes incisivos capaces de cortar y con una serie de molares para triturar, características típicas de herbívoros (Jobling, 1995; Moyle & Cech, 2000). Su estómago en forma de saco musculoso, le permite triturar a sus presas, presenta ciegos pilóricos (en promedio 6), ambas estructuras son típicas de peces carnívoros (Luczkovich & Stellwag, 1993). Es así que, su habilidad para consumir plantas radica en las adaptaciones morfológicas propias de la especie, sin embargo, su capacidad de digerir material vegetal, depende de la actividad enzimática digestiva (celulasa), que le permite hidrolizar compuestos de alto peso molecular, actividad que se realiza en su largo intestino (Luczkovich & Stellwag, 1993).

Recientemente, debido al creciente número de especies de peces que se adaptan al cultivo desde las etapas larvarias, lo cual se pretende realizar en un futuro próximo con el sargo, se han multiplicado el número de trabajos que evalúan cuantitativa y cualitativamente la actividad de las enzimas digestivas presentes, y su comportamiento durante las diferentes etapas del desarrollo, determinando, así mismo, los factores que condicionan su actividad (Baglole *et al.,* 1998; Gawlicka *et al.,* 2000; Moyano *et al.,* 1996, Martínez *et al*., 1997). Estos conocimientos son básicos para el desarrollo de la biotécnia de producción de cualquier especie, incluida el sargo.

La principal utilidad de tales estudios, es establecer mediante los niveles de actividad enzimática digestiva el grado de madurez funcional del aparato digestivo de la especie en estudio, lo cual no se ha determinado en el sargo. En un principio, para conocer en que momento durante la ontogenia inicial, las enzimas digestivas alcanzan su máxima actividad, lo que permitirá iniciar con el proceso de deshabituación o destete, es decir, el cambio del alimento vivo por el inerte. Previo a la descripción de la actividad enzimática digestiva de las larvas, es necesario la

reproducción en cautiverio de la especie, para la obtención de éstas.

En juveniles establecer sus requerimientos de proteínas y lípidos que cubran las necesidades nutricionales de la especie, en base a su actividad enzimática digestiva, para el diseño de dietas prácticas, elaboradas con ingredientes digeribles, que permitan un adecuado crecimiento de los organismos en cultivo.

Los aspectos antes mencionados fueron abordados en la presente investigación en el sargo, con éste propósito se plantearon las siguientes hipótesis:

- **Si** el sargo se adapta bien a condiciones de cautiverio, **entonces** se logrará la madurez sexual y el desove inducido a través de hormonas para la producción de larvas.

- **Si** los cambios morfofisiológicos de *A. probathocephalus* durante la transformación de larva a juvenil están relacionados con la actividad enzimática digestiva y siendo un organismos omnívoro, **entonces** la actividad de las proteasas determinará su tiempo de deshabituación tempranamente, y los requerimientos nutricionales en juveniles estarían en menos del 40 % de proteínas y 10 % de lípidos.

Para probar las hipótesis de esta investigación se planteó el siguiente objetivo general:
Describir la fisiología enzimática digestiva de larvas de sargo (*A. probatocephalus)*, obtenidas de la reproducción en cautiverio, y de juveniles silvestres, a fin de determinar los requerimientos nutricionales esenciales, para la formulación de dietas artificiales.

De este objetivo general se derivaron cuatro objetivos particulares, los cuales fueron abordados por separado en una estructura conformada por capítulos. Los alcances de cada capítulo se describen a continuación:

En el capítulo 1, se aborda el acondicionamiento y reproducción en cautiverio de la especie, para la obtención de eleuteroembriones y larvas, los cuales se utilizaron en la descripción morfo-funcional de su tracto digestivo.

La descripción morfofuncional del tracto digestivo de larvas, es abordada en el capítulo 2, en el se describen los cambios morfológicos y fisiológicos, que sufre el tracto digestivo durante la ontogenia inicial del sargo, por medio de técnicas bioquímicas e histológicas, lo que permitió determinar el tiempo óptimo de destete o deshabituación para las larvas de sargo.

En el capítulo 3, se describe la evaluación de la actividad enzimática digestiva de juveniles de sargo, con la caracterización de las proteasas y la acción de otras enzimas digestivas, así como la evaluación de la digestabilidad *in vitro* de diferentes ingredientes, tanto vegetales como animales, por medio de técnicas bioquímicas y electroforéticas, para la selección de ingredientes en la elaboración de dietas practicas.

Derivado de los resultados obtenidos en el apartado anterior, en el capítulo 4 se establece por medio de dos ensayos, la evaluación de dietas con diferentes niveles de proteína y de lípidos sobre el crecimiento y eficiencia alimenticia de juveniles de sargo, que señalan una aproximación a los requerimientos de la especie de estos importantes nutrientes.

En el capítulo 5, se abordan las principales contribuciones de esta investigación, a la fisiología digestiva del sargo, con la discusión integral de los resultados y conclusiones obtenidos en esta investigación, que dan respuesta a las hipótesis que dieron origen a la presente tesis.

En términos generales la presente investigación aporta el conocimiento del acondicionamiento y reproducción en cautiverio de la especie, y aspectos muy importantes de la fisiología digestiva del sargo, tales como: el desarrollo morfo-funcional del tracto digestivo de larvas, y en juveniles; la actividad de las enzimas digestivas, la digestibilidad *in vitro* de diferentes ingredientes y los requerimientos en proteínas y lípidos.

CAPÍTULO 1

ACLIMATACIÓN Y REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO DE SARGO (*Archosargus probatocephalus*)

1.1 Resumen

El sargo (*A. probatocephalus*) es una especie prioritaria para el desarrollo de la maricultura en el sureste mexicano. Sin embargo, actualmente su cultivo esta limitado por la disponibilidad de crías, por lo que es importante su reproducción en cautiverio. El objetivo de este estudio fue reproducir en cautiverio dos lotes de sargos, uno aclimatado en cautiverio por 12 meses y otro de reproductores silvestres. El lote en cautiverio se formó por 36 organismos, en un sistema de recirculación de agua a una salinidad de 10 psu; a los que se les determinó mensualmente el incremento en longitud y peso, se promovió la madurez sexual incrementando gradualmente la salinidad del sistema hasta 35 psu, posteriormente, se indujo al desove con una inyección intramuscular de 500 UI kg^{-1} de hormona gonadotropina coriónica y sérica. Por otra parte, el segundo lote se conformo de 15 reproductores silvestres, colectados de la laguna de Alvarado Veracruz, induciéndolos al desove de la misma forma. El incremento promedio en longitud de los organismos aclimatados al cautiverio fue 0.068 ± 0.01 cm d^{-1} y en peso promedio de 1.72 ±0.2 g d^{-1}, madurando sexualmente en el mes de enero. Ambos lotes desovaron y los huevos obtenidos midieron en promedio de diámetro de 817.3 ± 20.9 µm, presentaron un volumen del saco vitelino promedio de 243 ± 11 nL, diámetro promedio de la gota de aceite de 203.5 ± 16.5 µm y longitud notocordal promedio de los eleuteroembriones de 1.65 ± 0.25 mm. Los huevos y larvas de los reproductores silvestres fueron más grandes que los obtenidos de los organismos aclimatados y madurados sexualmente en cautiverio, registrándose diferencia significativa entre ambos lotes. Es posible lograr la maduración en cautiverio del sargo, así como, obtener larvas de calidad a partir de la inducción de reproductores mantenidos en cautiverio y silvestres en su época reproductiva, lo que permitirá en un futuro próximo el desarrollo de su cultivo.

1.2 Introducción

El sargo (*A. probatocephalus*) es una especie gonocórica y desovadora parcial (Patillo *et al*., 1997), madura generalmente a los dos años de edad (Wenner, 2004, Tucker, 2004). Desova en los arrecifes cercanos a las costas del Atlántico medio y sur de EUA y en los estuarios del Golfo de México, a finales de invierno y principios de primavera (Render & Wilson 1992, GSMFC, 2006). McDonough y colaboradores (2011) reportaron en Carolina del Sur EUA, la época de reproducción de enero a abril. La talla de primera madurez para *A. probatocephalus* es de 35 cm en las costas de los EUA (Wenner, 2004). El promedio del diámetro del ovocito maduro es de 400 µm, que es el tamaño en el que Tucker & Barbera (1987) y Tucker (1998) recomiendan el uso de la hormona gonadotropina coriónica humana para inducir a desove el sargo.

McDonough y colaboradores (2011) señalan que la fecundidad parcial promedio de la especie es variable, correlacionándose de forma positiva con la longitud patrón, el peso y la edad. La frecuencia de desove varía, desde una vez al día por siete días, hasta una vez cada 20 días (Munyandorero *et al.,* 2006). La fecundidad total de hembras capturadas en aguas costeras, es de 1 100 a 40 000 ovocitos por desove, en contraste, en hembras capturadas en alta mar, es de 14 000 a 250 000 ovocitos por desove (GSMFC, 2006). En cautiverio Tucker & Barbera (1987) obtuvieron 15 000 huevos desovados de forma manual, a partir de individuos con peso promedio de 378 g.

Para inducir al desove en cautiverio, existen registros del empleo de la hormona gonadotropina coriónica humana (HGCH), empleada en otras especies de la familia Sparidae, como la dorada *Sparus aurata* (Gordin & Zohar 1978, Colombo *et al.,* 1989), en dosis que varían de 100 a 250 UI kg^{-1}, o en el sargo, Tucker & Barbera (1987) y Tucker (1998), reportan el empleo de 1000 a 2000 UI kg^{-1}, sugiriendo estos autores dividir la dosis en dos aplicaciones, separadas de 24 a 36 h, entre cada aplicación, logrando la ovulación y el desove de 24 a 76 h después de la inyección de la hormona.

Los huevos producto de los desoves son pelágicos, miden en promedio 0.82 mm de diámetro (Tucker & Alshuth, 1997), poseen una gota de aceite que mide 214 ± 27 µm, eclosionan 28 h después de la fecundación, a temperatura de 23 ºC. Tucker & Barbera (1987) reportan una tasa de fertilización de 59 % y de eclosión del 86 %. La longitud de la larva al eclosionar es de 1.65

±0.15 mm (Tucker, 2004), a los tres o cuatro días después de la eclosión los ojos y el sistema digestivo son funcionales y comienza su alimentación exógena, al cuarto día post-eclosión, el vitelo y la gota de aceite se agotan y la larva se alimenta de forma eficiente (Tucker & Alshuth 1997).

Para la evaluación de la calidad de los desoves se considera en primera instancia la calidad de los huevos, los cuales deben tener la habilidad de ser fertilizados y desarrollar un embrión viable (Bobe & Labbé, 2010). Aunque las tasas de fertilización y eclosión son los indicadores más ampliamente utilizados en la evaluación de los desoves, otros parámetros como la morfología del huevo, su diámetro, la distribución de sus gotas de aceite, la anormalidad de los blastómeros, el tamaño de las larvas, el volumen del saco vitelino y la deformidad larval, pueden también ser considerados como indicadores confiables de la evaluación (Thorsen *et al*., 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2005; Rideout *et al*., 2005).

Así, aunque pareciera que se conocen las técnicas de reproducción de la especie, el manejo de reproductores aclimatados al cautiverio no se ha realizado de manera exitosa (Tucker & Barbera 1987, Tucker 1998, 2004), lo cual es esencial para la obtención de larvas de manera eficiente, por lo que el objetivo del presente estudio fue la obtención de larvas viables, através de la inducción al desove de dos lotes de sargos, uno mantenido en cautiverio por un año y otro silvestre.

1.3 Material y métodos

1.3.1 Lote madurado sexualmente en cautiverio

En febrero del 2014 se capturaron 45 juveniles de sargo (*A. probatocephalus*), de la laguna de Alvarado, Ver., con peso y longitud furcal promedio de 90 ±5 g y 10±1 cm respectivamente. Los cuales se transportaron en contenedores con aireación al Laboratorio de Acuacultura del Instituto Tecnológico de Boca del Río, donde se les administró un baño profiláctico con peróxido de hidrógeno a 400 ppm por 30 min y agua dulce. Posteriormente fueron colocados en un sistema de recirculación en donde permanecieron por un año. Dicho sistema estuvo conformado por dos tinas de fibra de vidrio con capacidad de 23 m^3, con un filtro biológico de 7 m^3. Los peces se colocaron a una densidad de un organismo por m^3. El seguimiento de la calidad del agua del sistema, se llevó a cabo con una sonda multiparamétrica (Hanna HI 9828), manteniendo los

parámetros dentro de los siguientes rangos: salinidad 10 ±1 psu, temperatura de 25.5 ± 3°C, oxígeno disuelto 4.5 ± 0.3 mg L^{-1} y amonio total de 0.1 mgL^{-1}. Se registró la supervivencia (%) de los organismos, la longitud furcal (LF) en cm con un ictiómetro y el peso en g con una báscula digital Ohaus® (0.01 g), por medio de biometrías mensuales.

Los organismos se aclimataron al cautiverio por medio de la administración inicial *ad libitum* de ostión y pescado fresco, por cinco días y gradualmente se cambió a alimento balanceado semihúmedo con 45 % de proteína y 12 % de lípidos, el cual estuvo conformado por alimento balanceado de iniciación para tilapia (Purina), filete de pescado fresco, calamar, lecitina de soya, aceite de pescado, alginato de sodio y premezcla de vitaminas y minerales. Al octavo mes de su acondicionamiento, se indujeron a la madurez sexual por medio del incremento de forma gradual de la salinidad del sistema, 5 psu cada semana, sustituyendo semanalmente un ¼ del agua del sistema con agua marina hasta obtener una salinidad de 35 psu. A partir del mes de noviembre se determinó su grado de madurez sexual por medio de biopsias de la gónada, extrayendo una muestra por canulación urogenital, con un tubo de polietileno de 0.86 mm de diámetro interno, misma que fué observada al microscopio compuesto (Carl Zeiss, Primo Star) a aumento de 10x. Se registró la morfología y el diámetro de los ovocitos de las hembras, y la movilidad de los espermas, la apariencia y fluidez del semen de los machos.

1.3.2 Lote de organismos silvestres

En el mes de febrero del 2015 se capturaron en la laguna de Alvarado, Ver. 15 organismos, 5 hembras y 10 machos con peso de 600 ± 200 g y 26 ± 2 cm de LF, los cuales formaron el lote de organismos silvestres, mismos que se transportaron al Laboratorio de Acuicultura del Instituto Tecnológico de Boca del Río, para su revisión, aplicando un tratamiento profiláctico similar al del lote acondicionado al cautiverio. Se determinó su grado de madurez sexual como se describe en el apartado anterior.

1.3.3 Manejo de reproductores y huevos

A los peces maduros sexualmente en ambos lotes; -machos con semen fluido y hembras con ovocitos en vitelogénesis avanzada con más de 400 μm de diámetro-, se registró su peso y se indujo el desove con una aplicación intramuscular de 500 UI kg^{-1} de hormona gonadotropina coriónica y sérica de uso veterinario (PG 600 Intervet). Una vez aplicada la inyección de la hormona, se colocaron los reproductores en una proporción de 1:2 (dos hembras y cuatro machos por tina), en un sistema cerrado de recirculación, integrado por dos tinas de fibra de vidrio de 1.2 m^3, acopladas a un reservorio de sedimentación y filtro biológico, con capacidad de 620 L. Se registró el tiempo en que los organismos desovaron después de la inyección de la hormona, y se evaluó la viabilidad del desove, colocando los huevos en una probeta de cristal de 1000 ml, para luego esperar a que se separaran los huevos viables en la parte superficial y los inviables en el fondo. Los huevos viables de cada desove se colocaron en una incubadora invertida de 100 L, con aireación suave y sin recambio de agua, hasta su eclosión.

1.3.4 Manejo de larvas

Los eleuteroembriones obtenidos se mantuvieron en peceras de vidrio de 60 L a una densidad de 100 organismos L^{-1} con aireación suave, con adición de la microalga *Nannochloropsis oculata* en concentración de 100 000 cel ml^{-1}. La alimentación exógena inició a partir del segundo día después de la eclosión (DE) se suministró el rotífero *Brachionus plicatilis* morfotipo L (5 rotíferos ml^{-1}). Los parámetros de la calidad del agua se determinó con una sonda multiparamétrica (Hanna HI 9828), manteniendo los parámetros dentro de los siguientes rangos: salinidad 35 ± 1 psu, temperatura de 21.5 ± 0.5 °C, oxígeno disuelto de 4.2 ± 0.3 mg L^{-1} y amonio total de 0.1 mg L^{-1}. Para evaluar la calidad de los desoves, se registró el diámetro de la gota de aceite, el volumen del saco vitelino y el tamaño promedio de los huevos y eleuteroembriones, para lo cual se utilizó un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Primo Star) con micrómetro ocular con aumento de 4x. Durante los nueve días que sobrevivieron las larvas, se evaluó el crecimiento en longitud notocordal (LN) (mm) y la tasa de supervivencia (% d^{-1}).

1.3.5 Análisis estadístico

De los datos obtenidos del diámetro de la gota de aceite, el volumen del saco vitelino y el tamaño promedio de los huevos y eleuteroembriones recién eclosionados se verificó la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Chakravarti *et al*., 1967) y la homocedasticidad por medio de la prueba de Levene (Hotelling, 1988). Posteriormente se procedió a aplicar el análisis paramétrico para la comparación de medias entre grupos, con la prueba de *t* de Student de muestras independientes, utilizando un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica v 7.1 .

1.4 Resultados

1.4.1 Desove de organismos madurados sexualmente en cautiverio

El período de pre-acondicionamiento de los organismos duró 21 d, con mortalidad del 20 %, sobreviviendo 36 de los 45 organismos capturados. Durante la adaptación al consumo de alimento balanceado semihúmedo, no se presentó mortalidad en los organismos. Transcurridos los 12 meses de cultivo, se registró un peso promedio final de 720 ± 50 g y LF de 35 ± 4 cm (Figura 1), con tasa de crecimiento en longitud de 0.068 ± 0.01 cm d^{-1} y en peso de 1.72 ± 0.2 g d^{-1}.

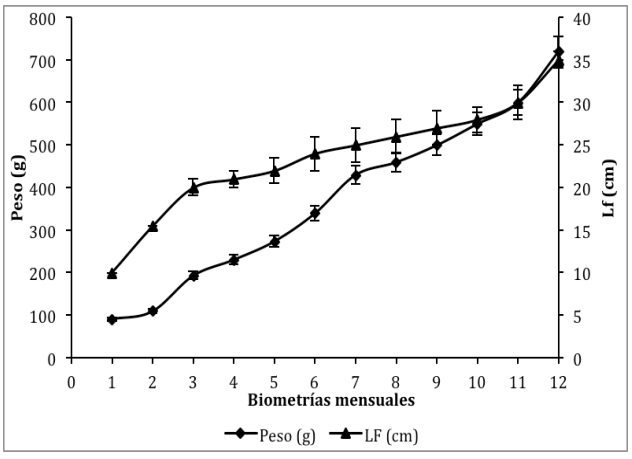


Fig. 1 Peso promedio (g) y longitud furcal promedio (LF) (cm) ± DE, registrados en sargos *(A. probatocephalus)* acondicionados al cautiverio por un año.

En el mes de septiembre los peces se encontraron inmaduros sexualmente, las hembras presentaron ovocitos en estadio de previtelogénesis con diámetro promedio de 190 ± 22 µm, en noviembre todos los organismos alcanzaron el peso y la talla de primera madurez registrada para la especie, de 336 g y 28 cm, respectivamente. Los ovocitos en vitelogénesis con diámetro promedio de 350 ± 35 µm, se presentaron en diciembre (Figura 2). La madurez sexual se alcanzó en enero, en la misma temporada en que lo hacen en el medio natural, observándose un 67 % de organismos maduros: ocho hembras con ovocitos en vitelogénesis avanzada y en hidratación con diámetro de 420 a 790 µm y 16 machos con semen fluido. El resto de los organismos (33 %) no maduraron sexualmente. El peso y talla promedio de los peces inducidos fue de 560 ± 50 g y 30 ± 1.3 cm. A las 48 h post-inyección de la hormona los reproductores desovaron. Se obtuvieron un total de 60 000 huevos viables kg^{-1}, con una tasa de eclosión del 80 %, por medio de desoves parciales cada 24 h por cinco ocasiones; obteniéndose 35 000 huevos el primer día, 10 000 el segundo día y 5 000 los siguientes tres días.

Los huevos presentaron un diámetro promedio de 797.4 ± 10.3 µm, un volumen promedio del saco vitelino de 232 ±5 nL, diámetro de la gota de aceite promedio de 187 ± 10 µm, y LN promedio de los eleuteroembriones al eclosionar de 1.4 ± 0.16 mm, la supervivencia de las larvas al día siete después de la eclosión fue del 50 % y al día nueve DE la mortalidad fue del 100 % (Tabla 1). Los huevos y eleuteroembriones no presentaron anormalidades.

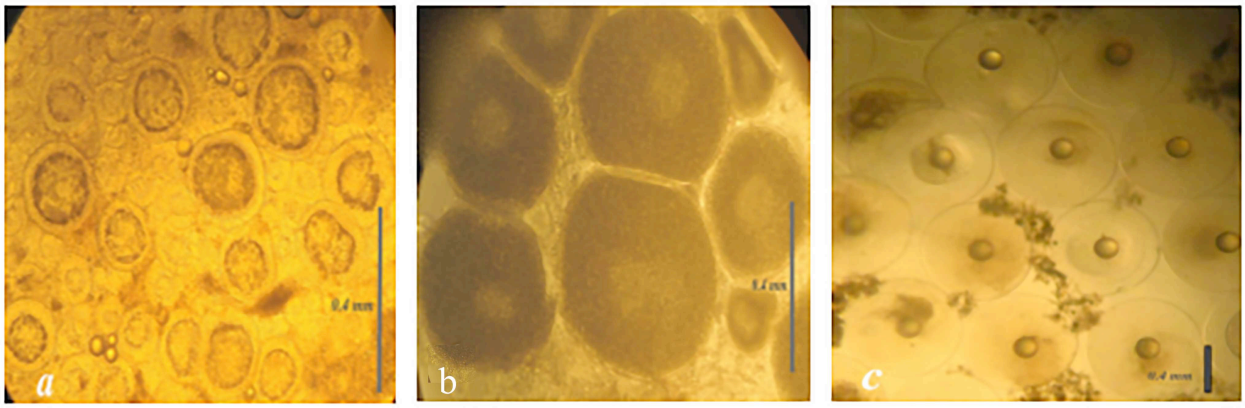


Fig. 2 Microfotografías de diferentes estadios de maduración sexual de ovocitos de sargo: (a) estadio previtelogénesis en el mes de septiembre de 2014, con diámetro de 190 ± 22 µm (n=30) (10x); (b) estadio de vitelogénesis, en el mes de noviembre de 2014, con diámetro de 350 ± 35 µm (n=28) (10x) y (c) estadio de hidratación con diámetro 790 ± 25 µm, en el mes de enero de 2015, con la evidente gota de grasa (n=30) (4x).

1.4.2 Desove de organismos silvestres

Del total de los reproductores silvestres, se detectaron dos hembras con peso y LF promedio de 1200 ±100 g y 35 ± 1.2 cm respectivamente, con ovocitos en vitelogénesis avanzada de 450 ± 25 µm y cuatro machos con semen fluido, con peso y LF promedio de 1000 ± 89 g y 30 ± 1 cm respectivamente. Mismos que fueron inducidos hormonalmente, lográndose el desove a las 72 h. posteriores a la inyección. De las hembras inducidas solo desovó una, se obtuvó un total de 40 000 huevos kg^{-1}, con desoves parciales cada 24 h por tres ocasiones, obteniéndose; 20 000 huevos el primer día, 10 000 huevos el segundo y tercer día. Los huevos midieron en promedio 838.2 ± 15.4 µm, el volumen del saco vitelino promedio fue 252 ± 4 nL, el diámetro de la gota de aceite promedio fue 220 ±7 µm y la tasa de eclosión del 60 %. Los huevos y eleuteroembriones no presentaron anormalidades. La LN promedio de los eleuteroembriones fue de 1.9 ± 0.16 mm, la supervivencia de las larvas al día siete después de la eclosión fue del 50 % y al día nueve la mortalidad fue 100 % (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los desoves, huevos y larvas de sargo (*A. probatocephalus*) obtenidos de reproductores madurados sexualmente en cautiverio y silvestres.

Características	**Desove de organismos madurados en cautiverio**	**Desove de organismos silvestres**	**Valores promedio**	**Prueba t Student**
Fecha de desove	6 enero 2015	14 febrero 2015	-	
Tiempo de desove post-inyección de la hormona	48 h	72 h	60 ± 12 h	
Huevos viables	100 000	60 000	80 000 ± 20 000	
Temperatura de desove (°C)	20.5 ±0.5	21.5 ±0.5	21 ± 0.5	
Salinidad de desove (psu)	35	35	35	
Desoves parciales	5	3	4±1	
Diámetro de los	796.4 ±10.3[a]	838.2 ±15.3[b]	817.3 ± 20.9	t 0.05=7.5, 20,

huevos (µm)				p=0.00001
Tasa de eclosión	80 %	60 %	70 %	
Volumen del saco vitelino (nL)	232 ±7.8 [a]	254.2 ±7.2 [b]	243 ± 11	t 0.05=6.9, 20, p=0.00001
Diámetro de la gota de aceite (µm)	187 ±15.4 [a]	220 ±7.1[b]	203.5 ± 16.5	t 0.05=6.6, 22, p=0.00001
Longitud notocordal de eleuteroembriones (mm)	1.4 ± 0.16 [a]	1.9 ± 0.1[b]	1.65 ± 0.25	t 0.05=10.2, 20, p=0.0000
Supervivencia de larvas al séptimo día DE	50 %	50 %	50 %	

Los superíndices diferentes en cada renglón indican diferencias significativas (P< 0.05), con la prueba *t* Student de comparación de medias de muestras independientes.

1.4.3 Descripción de eleuteroembriones y larvas

El análisis de comparación entre las medias de las variables registradas en ambos lotes con la prueba de *t* de Student, mostró diferencias significativas (P< 0.05) entre los registros del diámetro de la gota de aceite, el volumen del saco vitelino y el tamaño promedio de los huevos, eleuteroembriones y larvas de ambos lotes. El análisis del porcentaje de eclosión entre los grupos con la prueba de Chi^2, registró diferencias significativas, mientras que el análisis del porcentaje de supervivencia de las larvas entre los grupos, no difirió entre la procedencia de los reproductores, no registrándose diferencias significativas, en ambos lotes de larvas (Tabla 1).

Los principales cambios morfológicos registrados durante la ontogenia inicial del sargo fueron: el primer día DE se observaron los eleuteroembriones con su prominente saco vitelino y su única gota de aceite. Al día dos DE se observó en la mayoría de los eleuteroembriones el inicio de la reabsorción del saco vitelino. Al tercer día DE se completó en las larvas la pigmentación de los ojos. Al cuarto día DE, se verificó la abertura de la boca y ano, comienza en la mayoría de las larvas la alimentación exógena. En el quinto día DE se agotó el saco vitelino y la gota de aceite, se observó el desarrollo de aletas pectorales sin radios. Al sexto día DE se observó el inicio del

patrón de pigmentación característico de la especie con la presencia de melanóforos dendríticos en cabeza, ano y línea ventral. En el séptimo y octavo días DE no se observaron cambios aparentes, solo incremento en longitud. Al noveno día DE, algunas larvas inician el estadio de preflexión, con la aparición de aletas pectorales con radios (Figura 3). Las tallas promedios registradas en los eleuteroembriones y larvas se observan en la Tabla 2. Para determinar la causa de la mortalidad larval, se midió la abertura de la boca (n=30) con un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Primo Star) con micrómetro ocular con aumento de 4x, registrándose un valor promedio de 220 ±20 µm.

Tabla 2. Longitud de la notocorda (LN) registrada durante la ontogenia inicial de sargo *(*A. *probatocephalus*), día después de la eclosión (DE), N = tamaño de la muestra.

Día	**N**	**LN (µm)**	**Evento**
0	30	817.3 ± 20.9	Desove
1	30	1650 ± 25	Eclosión
2	20	2162.5 ± 43.3	Inicia reabsorción de saco vitelino
3	20	2443.8 ± 51.5	Se completa la pigmentación de los ojos
4	20	2475.0 ± 20.4	Abertura de boca y ano, comienza alimentación exógena
5	15	2471.9 ± 41.3	Agotamiento de saco vitelino y gota de aceite, desarrollo de aletas pectorales sin radios
6	15	2568.8 ± 65.7	Melanóforos dendríticos visibles en cabeza, ano y línea ventral, que marcan la pigmentación específica
9	15	2741.3 ± 23.9	Inicia preflexión, aletas pectorales con radios

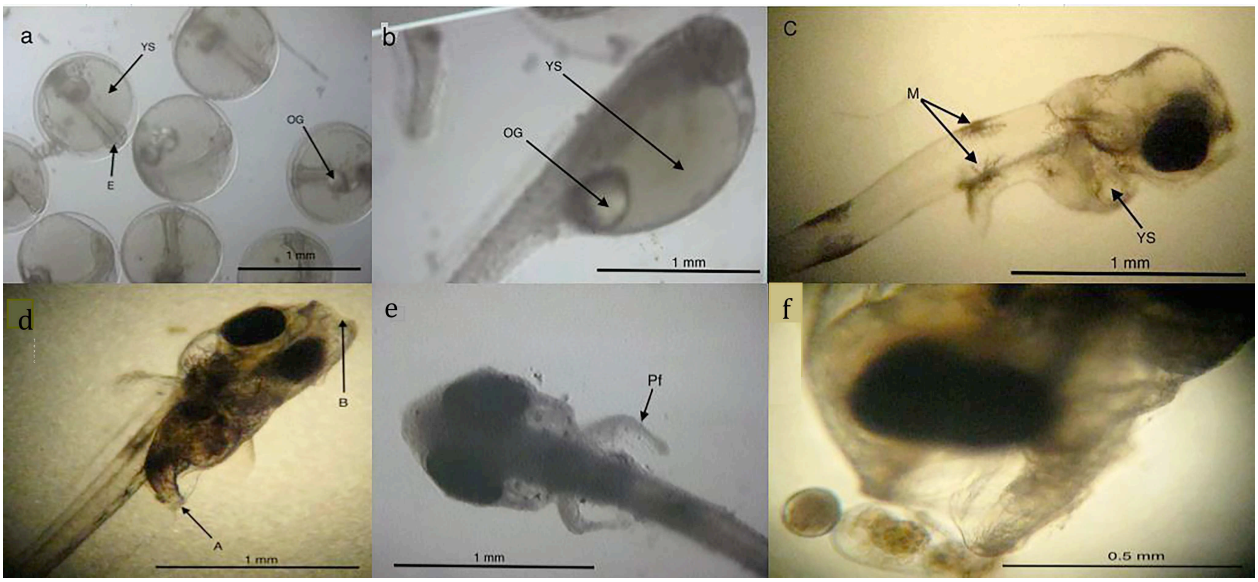


Fig. 3 Principales cambios morfológicos registrados en la ontogenia inicial de larvas de sargo (*A. probatocephalus*): (a) Huevos antes de la eclosión, se observa el embrión (E), el saco vitelino (YS) y la única gota de aceite (OG); (b) eleuteroembrión recién eclosionado (1 día DE), se señala el prominente saco vitelino (YS) y la gota de aceite (OG); (c) larva de 3 días DE, se observa la reabsorción parcial de saco vitelino (YS) y melanóforos dendríticos visibles (M); (d) larva de 4 días DE con boca (B) y ano (A) abiertos; (e) larva en preflexión a los 9 días DE, se observan las aletas pélvicas con radios (Pf); (f) parte anterior de larva y rotífero (R), microfotografías 4x.

1.5 Discusión

Se logró por primera vez la aclimatación y la madurez sexual de un lote de sargos en cautiverio, lo cual es un aporte importante en el desarrollo de la técnica de producción de la especie. Este lote registró durante los 12 meses de cultivo, un peso promedio de 720 ± 50 g, no se cuenta con un estudio similar para la comparación de los resultados obtenidos, solo existe un registro realizado por Tucker (1987), quien reportó un peso promedio de 480 g en 12 meses de cultivo, alimentando a los organismos con alimento comercial de salmón. Ambos estudios son diferentes, ya que Tucker (1987) registró el crecimiento a partir de larvas obtenidas en laboratorio, y en el presente estudio los peces fueron colectados del medio y se inició la evaluación de su crecimiento con pesos promedios de 90 g. Sin embargo, la tasa de crecimiento registrada se considera

adecuada, ya que no se registró mortandad en los organismos, maduraron sexualmente y se reprodujeron.

Se observó un incremento en peso de 1.72 ± 0.2 g d^{-1} y en longitud de 0.068 ± 0.01 cm d^{-1}, valor un poco menor a lo reportado por Tucker (1987), cuando alimentó un lote de sargos con alimento comercial de trucha. Esto se explica, ya que la tasa de crecimiento de los peces se modifica por diferentes factores como la temperatura, la densidad de organismos, el porcentaje de alimentación y el tipo de alimento (Lahti & Lower 2000, Wang *et al*., 2000).

La maduración sexual y desove de los organismos en cautiverio ocurre en el mes de enero, y en el lote de organismos silvestres en el mes de febrero, lo que coincide con lo reportado por Mc Donough *et al*., (2011) quienes señalan que esta especie se reproduce en las costas de Carolina del Sur EUA de enero a abril. La mayoría de los organismos maduraron sexualmente al año de su aclimatación en cautiverio, a diferencia de lo reportado por Tucker (1998, 2004) y Wenner (2004), quienes señalan lo hacen a los dos años. En este sentido Tucker & Barbera (1987), solo obtuvieron la madurez sexual, de algunos machos de un lote de sargos en cautiverio por un año, en condiciones de cultivo.

El hecho de que los organismos maduraran sexualmente en el presente estudio, pudo deberse a que la dieta suministrada, cubrió los requerimientos nutricionales de los reproductores, lo que permitió el desove, debido a que dicha dieta contiene ingredientes, reconocidos como componentes importantes en la elaboración de dietas de maduración de varias especies de peces marinos (Watanabe & Vassallo-Agius, 2003), tales como; el calamar, la lecitina de soya y el aceite de pescado. Por lo que se considera que estos ingredientes influyeron en la fecundidad de los peces, en la cantidad de huevos viables, en la reducción de anormalidades en huevos y embriones, así como en la tasa de eclosión, lo que se atribuye a los beneficios de su composición en ácidos grasos, nivel proteico, buena digestibilidad y a su contenido de fosfolípidos y colesterol, como lo señalan diferentes autores (Watanabe 1995, Fernández-Palacios *et al*., 1997, Watanabe & Vassallo-Agius, 2003).

Se logró el desove en ambos lotes de sargos, con 500 UI kg^{-1} de la HGCS, que es una hormona homologa de la HGCH, empleando una dosis menor que la recomendada para inducir al sargo por Tucker & Barbera (1987) y Tucker (1998) a dosis de 1000 a 2000 kg^{-1} de la HGCH. Cabe señalar que esta hormona es más económica que la HGCH y fácil de obtener, ya que es de uso veterinario. Así mismo, los peces acondicionados al cautiverio desovaron a las 48 h posteriores a la inyección y los peces silvestres a 76 h, este retraso puedo deberse al estrés provocado en la captura, traslado y manejo en los organismos silvestres.

En el presente estudio se observó que el promedio del diámetro del ovocito maduro fue 420 µm ±35, valores que son ligeramente mayores a lo reportado por Tucker & Barbera (1987), con este tamaño de ovocito se indujó al desove y se obtuvo una adecuada producción de huevos viables, con una mayor frecuencia de desoves parciales (de cuatro a cinco) post-inyección, que los reportados por Tucker (1998, 2004). Sin embargo se tuvo menor cantidad de huevos viables y de desoves parciales en el desove de los organismos silvestres, que en el lote de organismos acondicionados al cautiverio, esto se explica, por el estrés adicional en la captura y el traslado al que fue sometido éste lote, ya que existen registros que señalan, que dicha condición puede provocar en las hembras un retraso en la maduración del ovocito, vitelogénesis incompleta, inhibición de la ovulación y puesta. Lo que puede provocar en las hembras una atresia folicular acelerada y en los machos la inhibición de la espermiación y la disminución de la fluidez del semen (Goos & Casten 2002, Castranova *et al*., 2005). Estos efectos mencionados, así como su intensidad, pueden variar con la especie, el estado de madurez y el grado de tolerancia al estrés (Schreck *et al*., 2001).

Ambos desoves registrados en el presente estudio fueron considerados de buena calidad, en base a los criterios descritos por diferentes autores (Thorsen *et al*., 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2005; Rideout *et al*., 2005), que toman en cuenta principalmente los siguientes aspectos: las anormalidades presentes en huevos y embriones, así como las tasas de fertilización y eclosión, ya que los huevos y embriones obtenidos en ambos desoves, no presentaron anormalidades y las tasas de fertilización y eclosión fueron adecuadas.

Los huevos y larvas obtenidos del desove de los reproductores silvestres tuvieron mayor tamaño que los huevos y larvas obtenidos de los peces acondicionados en cautiverio; pero las tallas promedio registradas son similares a las reportadas por Tucker & Alshuth (1997). Esta diferencia pudiera deberse a que, para los peces aclimatados al cautiverio, se trataba de su primer desove, y para los peces silvestres por las tallas y pesos que presentaron posiblemente fuera su segunda o tercera época de reproducción, al respecto en estudios previos, se ha demostrado relación positiva entre el tamaño y la edad de las hembras y sus huevos, así como con la calidad del desove (Faulk & Holt, 2008; Quintero *et al*., 2009).

Existen reportes de que las mejores tasas de fecundación, eclosión y tamaño de huevos, se tiene con hembras de mediana edad (Trippel, 1998; Laine & Rajasilta, 1999). En algunas especies se ha demostrado que el diámetro del huevo aumenta con la edad de los reproductores, por lo que, huevos más grandes, producen por lo general larvas más grandes, con mayor cantidad de nutrientes de reserva (Kennedy *et al.,* 2007), como lo observado en el desove de los organismos silvestres.

La sobrevivencia de las larvas esta íntimamente relacionada con su eficiencia alimenticia, y es afectada por diferentes factores bióticos tales como; la densidad de la presa y su distribución, el tamaño, la movilidad, el color, el tamaño del depredador, el tamaño de la boca, así como el grado de desarrollo del sistema visual y del tubo digestivo (Planas & Cunha 1999; Utne-Palm, 1999; Seiffer *et al.,* 2001; Zavala-Leal *et al.,* 2013). El efecto de estos factores en la sobrevivencia registrada, permite dilucidar que, el tamaño de la presa y el tamaño de la boca de las larvas, fueron los que más influyeron, ya que aunque, tradicionalmente las larvas de peces marinos son alimentadas inicialmente con el rotífero *Brachionus plicatilis* morfotipo S o pequeño (Prieto *et al.,* 2006). En el presente estudio, fueron alimentadas con el morfotipo L (con un tamaño de 232-300 µm), que es más grande que la boca de las larvas de sargo, la cual midió en promedio 220 ±20 µm, comprobándose que su tamaño fue menor que del rotífero suministrado, lo que provocó que su supervivencia al séptimo día DE fuera del 50 %, un valor menor a la supervivencia larval registrada por Tucker del 62 % (1998, 2004). Al día nueve DE las larvas de ambos desoves, presentaron una mortalidad del 100 %, por inanición. Se desconocía al momento de administrar el primer alimento vivo el tamaño de la boca de las larvas, siendo más pequeña que el rotífero

suministrado. Al respecto Tucker & Barbera (1987) reportaron una supervivencia al séptimo día DE del 62 % y Tucker & Alshuth (1997) una supervivencia del 40 % a los 10 días DE, alimentando larvas de sargo con *B. plicatilis* morfotipo S, por lo que se tiene que revisar el esquema de alimentación para la obtención de mejores resultados en la supervivencia de las larvas en el futuro.

CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN MORFO-FUNCIONAL DEL TRACTO DIGESTIVO DURANTE LA ONTOGENIA INICIAL DE LARVAS

2.1 Resumen

El sargo es un pez marino con potencial para la maricultura en el Golfo de México, por lo que el manejo adecuado de su larvicultura es prioritario. En este sentido, en el presente estudio se describen los cambios morfológicos del tracto digestivo y de enzimas digestivas, que acontecen durante los primeros 10 días de vida. Al tercer día después de la eclosión, se verifica la abertura de la boca y el ano, y el intestino se desarrolla en anterior y posterior, el hígado y el páncreas inician su desarrollo desde los primeros días. El estómago comienza su diferenciación tempranamente, verificándose la presencia de glándulas digestivas encargadas de la síntesis de pepsina el día 9 DE. Durante el período de estudio, todas las actividades enzimáticas digestivas se detectaron con valores bajos desde la absorción del saco vitelino, a partir del día 4 DE, incrementaron gradualmente hasta el día 10 DE. Se detectaron los valores máximos el día 10 DE para las siguientes enzimas: proteasa ácida (0.12 U mg proteína^{-1}), proteasas alcalinas (0.23 U mg de proteína^{-1}), tripsina (0.045 mU 10^{-4} mg de proteína^{-1}), quimotripsina (0.35 mU mg de proteína^{-1}), amilasa (0.13 U mg de proteína^{-1}), fosfatasa alcalina (0.07 mU mg de proteína^{-1}) y lipasa (03.32 mU mg de proteína^{-1}). Para la leucina aminopétidasa se registraron los mayores valores el día 7 DE (0.1mU 10^{-5} mg de proteína^{-1}), y para la carboxipéptidasa A (0.5 mU mg de proteína^{-1}) en el día 9 DE. La ontogenia enzimática digestiva de *A. probatocephalus* es similar a la de otros peces marinos, y por sus características digestivas se sugiere que su destete pudiera realizarse tempranamente, alrededor de los 15 días DE.

2.2 Introducción

En los peces, el adecuado desarrollo del aparato digestivo es esencial para el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Kjorsvik *et al*., 2004). Al inicio del desarrollo larval, durante su primera alimentación exógena, las larvas deben cazar rápidamente a sus presas para capturarlas, digerirlas y absorberlas, ya que, su tracto digestivo, no se encuentra todavía totalmente

desarrollado (Canino & Bailey, 1995). Durante las primeras semanas de vida el desarrollo del canal alimentario presenta cambios histológicos, morfológicos y fisiológicos, dirigidos por procesos de naturaleza genética y ambiental (Rønnestad *et al.,* 2001).

La mayoría de los peces exiben una ontogenia indirecta, ya que los embriones al eclosionar presentan un rudimentario sistema digestivo, que se completa durante su desarrollo larval. La diferenciación del tubo digestivo se inicia al terminarse la absorción del saco vitelino, y termina al finalizar el periodo larvario, que es cuando la cría presenta un tracto digestivo completamente funcional (Álvarez-González *et al.,* 2008). Durante el desarrollo larval el estómago cambia su actividad proteolítica del tipo tripsina al tipo pepsina, realizando una digestión ácida (Moyano *et al*., 2005), así mismo, se desarrollan el intestino, las glándulas gástricas, los ciegos pilóricos y otros órganos que participan en la digestión (Lazo, 2000). De tal manera que, el desarrollo del estómago, señala el cambio de larva a cría, la cual ya posee un sistema digestivo completamente formado, que le permite su alimentación de manera adecuada (Lazo, 2000; Álvarez-González, 2003).

Las enzimas digestivas son secretadas en la mucosa estomacal, páncreas, vesícula biliar y las paredes intestinales. Aunque también pueden provenir del alimento vivo o de las bacterias de la flora intestinal (Lazo *et al.,* 2000). A nivel intestinal, la digestión puede ser de dos tipos: intracelular y extracelular (Smith, 1989). La digestión intracelular se realiza principalmente en la región posterior del intestino (Watanabe, 1984), y compensa la baja digestión extracelular que se presenta durante la etapa larvaria (Watanabe, 1984; Cahu & Zambonino-Infante, 1995). Las enzimas que participan en la digestión intracelular se localizan en el lumen intestinal (tripsina y quimotripsina) y las asociadas al epitelio intestinal (aminopéptidasa y fosfatasa alcalina).

Durante la ontogenia inicial de larvas, la presencia de glándulas gástricas con la consecuente secreción de altos niveles de pepsina, son los indicador morfo-fisiológico de la plena madurez del estómago. En el intestino los indicadores de una adecuado desempeño digestivo lo son los incrementos sostenidos de la acción de las enzimas aminopéptidasa y fosfatasa alcalina, dichos cambios señalan el avance de la maduración digestiva. La presencia de estas tres condiciones son indicadores puntuales del estado avanzado de madurez del tracto digestivo en los primeros

estadios del desarrollo de peces (Guerreiro *at al*., 2010).

Se han registrado un buen número de trabajos que abordan la actividad enzimática digestiva durante las primeras semanas de vida en peces marinos tales como: *Dicentrarchus labrax* (Alliot *et al*., 1977), *Lates calcarifer* (Walford & Lam, 1993), *Hippoglossus hippoglossus* (Gawlicka *et al*., 2000), *Paralichthys californicus* (Álvarez-González *et al.,* 2006), *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.,* 2008), *Centropomus undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.,* 2012) y en diferentes especies de la familia esparidae, que es a la que pertenece el sargo, como *Acanthopagrus shlegelis* (Kawai & Ikeda, 1973), *Sparus aurata* (Moyano *et al*., 1996), *Diplodus sargus* (Cara *et al.,* 2003; Guerreiro *et al*., 2010), *Pagrus auriga* (Moyano *et al*., 2005) y *Dentex dentex* (Gisbert *et al.,* 2009). Estos estudios permiten establecer, mediante los niveles de actividad enzimática, el grado de madurez funcional del aparato digestivo de la especie, para determinar el momento más adecuado de la deshabituación en la sustitución parcial o total del alimento vivo por el inerte (Kolkovski, 2001; Zambonino-Infante & Cahu, 2001).

El sargo (*A. probatocephalus*) es una especie susceptible de cultivo (Tucker, 1998, 2004). Sin embargo, no se cuenta con la descripción del desarrollo morfo-funcional del tracto digestivo de larvas, lo cual es muy importante para su adecuado manejo durante el destete, lo que permitirá obtener mayor supervivencia de larvas y por ende, un abastecimiento adecuado de crías que permita su cultivo. Referente al desarrollo temprano de esta especie Tucker & Alshuth (1997) reportan, que las larvas de sargo muestran a los tres días DE, la abertura de la boca y el ano, con una boca capaz de atrapar el alimento, al día 4 DE sus ojos se encuentran completamente pigmentados y su aparato digestivo es funcional, comenzando su alimentación exógena, alimentándose de manera eficiente. Estos mismos autores también señalan que la transformación de larva a cría, se lleva acabo entre los días 28-30 DE. Por lo mencionado anteriormente, el objetivo del presente estudio fue describir por medio de técnicas histológicas y bioquímicas el desarrollo morfo-funcional del tracto digestivo durante la ontogenia inicial de larvas, para sugerir el tiempo propicio de destete para la especie.

2.3 Material y métodos

2.3.1 Obtención de larvas y toma de muestras

Los huevos, eleuteroembriones y larvas de *A. probatocephalus* fueron obtenidos a partir de un desove de reproductores aclimatados al cautiverio, como se describe en el capítulo anterior, mantenidos en las instalaciones del Laboratorio de Acuacultura del Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz, México,

Los eleuteroembriones y larvas fueron confinados en peceras de vidrio de 60 L a densidad de 100 organismos L^{-1} con aireación suave, adicionando la microalga *Nannochloropsis oculata* en una concentración de 100 000 cel mL^{-1}. La alimentación exógena inició a partir del segundo DDE suministrando el rotífero *Brachionus plicatilis* morfotipo L (5 rotíferos ml^{-1}). Los parámetros de la calidad del agua se determinaron diariamente con una sonda multiparamétrica (Hanna HI 9828).

Para la descripción histológica se muestrearon diariamente por díez días 30 organismos (eleuteroembriones y larvas) sacrificados con un shock térmico y posteriormente fijados por 24 horas en solución de Bouin. Así mismo, para los ensayos de la actividad enzimática digestiva se tomaron diariamente dos muestras conformadas por 100 organismos cada una, las cuales fueron sacrificadas de la misma manera y almacenadas en un ultracongelador a -20 °C hasta su uso.

2.3.2 Procesamiento histológico

Las muestras fijadas en solución de Bouin fueron lavadas repetidamente en agua destilada y posteriormente, deshidratados con series crecientes de alcohol (50, 70, 80 90 y 100 %), embebidas en parafina, en un procesador de tejidos (Histolab ZX-60, Tarragona, España), formándose finalmente los bloques de parafina. A continuación, se realizaron cortes de 3 μm de grosor, con un micrótomo automático (Leica Microsystems Nussioch, Alemania). Posteriormente se desparafinaron con series crecientes de xileno, teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Treviño *et al*., 2010). Las preparaciones histológicas fueron montadas en resina sintética y observadas en un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Primo Star) a diferentes aumentos, para constatar los cambios morfológicos durante la ontogenia inicial y su registro fotográfico (cámara

digital Olympus DP70).

2.3.3 Actividad enzimática digestiva

Se prepararon extractos multienzimáticos a partir de los eleuteroembriones y larvas completos, en una proporción de 200 mg ml^{-1} (p/v), procesando las muestras de cada día por separado hasta el día 10 después de la eclosión, homogenizándose cada muestra en frío con el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (15 mg ml^{-1}), se centrifugaron posteriormente por 15 min a 4 °C a 16 000 g, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C, para su análisis. La concentración de proteína soluble de los extractos se determinó con la técnica de Bradford (1976), usando la albúmina sérica bovina como estándar.

La actividad de proteasa alcalina se determinó con el método de Walter (1984), utilizando como sustrato caseína al 0.5 %, con tampón Tris HCl 50 mM a pH 9. La actividad de proteasa ácida (pepsina) se evaluó con la técnica de Anson (1938), se empleó como sustrato hemoglobina al 0.5 % con tampón glicina HCl 0.1mM, pH 2. Ambas mezclas se incubaron a 37 °C, deteniéndose la reacción con 0.5 ml de TCA al 20 %, se midió la absorbancia de los productos a 280 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como 1 μg de tirosina liberada por minuto, con un coeficiente de extinción molar (0.005). La actividad tripsina se determinó con la técnica de Erlanger *et al*., (1961), a 25 °C, utilizando como sustrato BAPNA (N-alfa-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide) con tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8.2 (más $CaCl_2$ 10 mM). La actividad quimotripsina fue registrada con la técnica de Del Mar *et al.,* (1979), empleando como substrato SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) en DMSO 10 mM y Tris HCl 100 mM (más $CaCl_2$ 10 mM) a pH 7.8, a temperatura de 25 °C. La actividad carboxipeptidasa A fue evaluada con la técnica de Folk y Schirmer (1963), empleando como sustrato Hippuryl-L-phenyl-alanine disuelto en 0.025M Tris-HCl (con NaCl 0.5M) a un pH 7.5. La actividad leucina-aminopéptidasa se determinó a 25 °C utilizando como sustrato Leucina p-Nitroanilida en DMSO 0.1 mM, en fosfato sódico 50 mM, a pH 7.2 (Maraux *et al*., 1973). La actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y leucina-aminopéptidasa se definió como la liberación de 1 μg de nitroanilida por minuto, con un coeficiente de extinción molar de 8.8.

La actividad α-amilasa se determinó empleando como sustrato almidón al 2 % en tampón fosfato-citrato 0.1 M+NaCl 0.05 M a pH 7.5, registrándose la absorbancia a 600 nm, siguiendo la técnica de Robyt & Whelan (1968). La actividad de lipasa se cuantificó con la técnica propuesta por Versaw *et al*., (1989), empleando como sustrato ß- naftil caprilato 200 mM disuelto en Tris-HCl 50 mM a pH 7.2 y taurocolato sódico 100 mM, se incubó por 30 minutos, se leyó la absorbancia a 540 nm. Se definió la actividad como 1 μg de naftol liberado por minuto, utilizando un coeficiente de extinción molar de 0.02.

La actividad fosfatasa alcalina se estimó empleando como sustrato el 4- nitrofenilfosfato, en buffer NaOH-glicina a pH 10.1, siguiendo la técnica propuesta por Bergmeyer (1974). La unidad de actividad se definió como 1μg de nitrofenol liberado por minuto. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.3.4 Análisis estadístico

Se verificó la normalidad de los datos de las diferentes edades (días), de cada actividad enzimática con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Chakravarti *et al.,* 1967) y la homocedasticidad con la prueba de Levene (Hotelling, 1988). Como los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se empleó un análisis de ANOVA de una vía, con una prueba a posteriori de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el programa Statistica V7.0 (Stat Soft, Tulsa, Ok, USA).

2.4 Resultados

2.4.1 Descripción histológica

Las larvas fueron mantenidas por espacio de 10 días, durante los cuales se registraron los siguientes parámetros promedio de la calidad del agua: salinidad 35 ± 1 psu, temperatura de 21.5 ± 0.5 $^{\circ}$C, oxígeno disuelto de 4.2 ± 0.3 mg L^{-1} y amonio total de 0.1 mgL^{-1}.

Los principales cambios morfológicos e histológicos durante la ontogenia inicial de *A. probatocephalus* son ilustrados en las figuras 1-10. En el momento de la eclosión, el sistema digestivo del sargo es un tubo recto rudimentario con boca y ano cerrados, localizado por arriba

del saco vitelino (Fig. 1 y 2). Los eleuteroembriones al eclosionar (día uno) presentaron una longitud notocordal promedio de 1.65 ± 25 mm y un prominente saco vitelino con un volumen promedio de 243 ± 11 nL. Al segundo día DE se inicia la reabsorción del saco vitelino, y al tercer día DE se registra la completa pigmentación de los ojos, lo que los hace funcionales para visualizar a sus presas. Este mismo día se verifica la abertura de la boca y el ano y se pone de manifiesto el desarrollo del intestino, diferenciándose en intestino anterior y posterior (Fig. 3 y 4). Al cuarto día DE las larvas se alimentaron eficientemente, se dio inició a la alimentación exógena. Al día 5 DE se agotó el saco vitelino y la gota de aceite, quedando solo vestigios de estos, al noveno día DE se inicia en la mayoría de las larvas la etapa de preflexión (Fig. 5 y 6).

La cavidad bucofaríngea comienzó su diferenciación a partir del día 3 DE, al cuarto día DE se aprecia la aparición de los primeros dientes hacia el lumen oral, al día 7 DE, surgieron las papilas bucofaríngeas, y se observaron las primeras células mucosas en esta zona y en el esófago (Fig. 7). Del día 7 al 9 DE se reconoce un esófago y estómago completamente funcionales, con la presencia de glándulas gástricas, que darían el inicio a la secreción de pepsina (Fig. 8). Las glándulas accesorias como el hígado y el páncreas exocrino, se desarrollaron tempranamente entre los días 3 y 4 DE. El hígado aparece formando lóbulos, conformado por hepatocitos poliédricos uninucleados con poco citoplasma, y el páncreas formado por cúmulos acinares de células, con gránulos de zimógeno (Fig. 9). El intestino anterior y posterior se presentaron funcionales desde el día 3 DE, desarrollándose conforme avanzaron los días, para el día 9 DE se observó la válvula intestinal completamente formada, misma que sirve de conexión entre ambos intestinos (Fig. 10).

Durante los diez días que duro el experimento, el sistema digestivo de *A. probatocephalus* experimentó una notable transformación, iniciando el desarrollo y diferenciación de los órganos digestivos, con la excepción del estómago, el cual completó su diferenciación alrededor de los días 9-10 DE (Fig.8). Desde el inicio y hasta el final del estudio (décimo día DE), los cambios morfológicos del sistema digestivo registrados, se asocian a la complejidad y tamaño de los órganos, conforme el crecimiento de las larvas.

Fig. 1 Microfotografía de eleuteroembrión de *A. probatocephalus* de un día después de la eclosión. Se señala el periblasto o capa sincitial del vitelo (p), vitelo (v), tubo digestivo rudimentario (td) 20x, Técnica. H-E.

Fig. 2 Microfotografía de eleuteroembrión de *A. probatocephalus* de dos días después de la eclosión. Se señala el vitelo (v), gota de aceite (ga), cavidad bucal cerrada (cb) y el ojo en formación (o) 20x, Técnica. H-E.

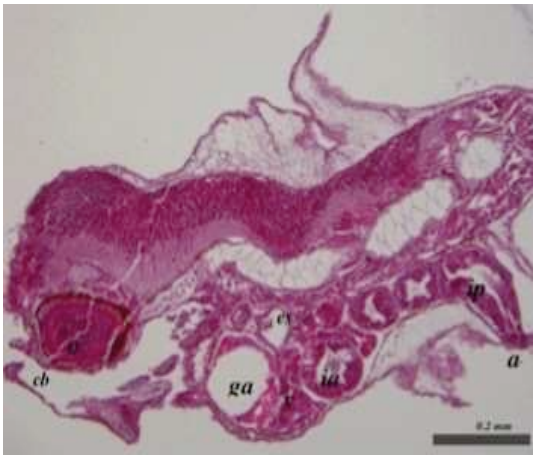


Fig. 3 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de tres días despúes de la eclosión. Se señala la cavidad bucal abierta (cb), vitelo (v), gota de aceite (ga), estómago vestigial (es), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), ano abierto (a) 20x, Técnica. H-E.

Fig. 4 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de cuatro días despúes de la eclosión. Señalando el vitelo (v), gota de aceite (ga), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), cavidad bucofaríngea (cbf), arcos branquiales (ab), hígado (h), páncreas vestigial (p), aletas pélvicas sin radios (ap), ojo (o) y células mucosas (cm). 20x, Técnica. H-E.

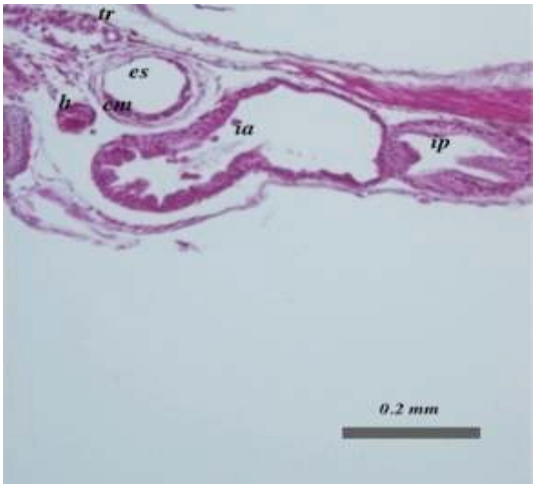


Fig. 5 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de siete días despúes de la eclosión. Señalando estómago (es), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), hígado (h), células mucosas (cm), túbulos renales (tr). 20x, Técnica H-E.

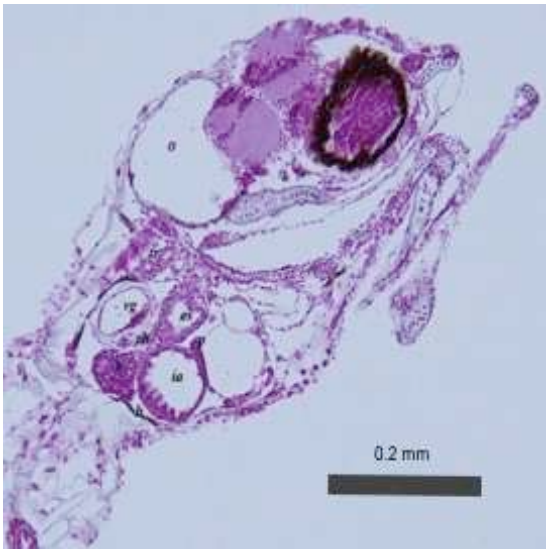


Fig. 6 Microfotografía de larvas de *A. probatocephalus* de nueve días despúes de la eclosión. Se señala el estómago (es), intestino anterior (ia), hígado (h), páncreas (p), túbulos renales (tr), vejiga gaseosa (vg), vesícula biliar (vb) y bazo (b). 4x, Técnica H-E.

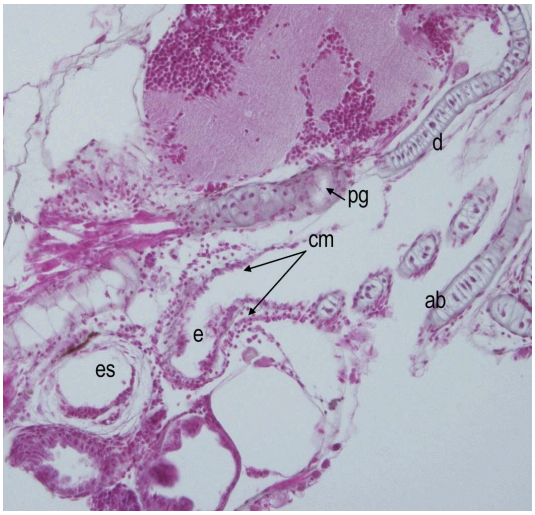


Fig. 7 Microfotografía de parte anterior de la cavidad bucofaríngea de larvas de sargo. Se aprecian los dientes (d), las papilas gustativas (pg), células mucosas (cm), esófago (e), estómago incipiente (es) y los arcos branquiales (ab), 20x, Técnica H-E.

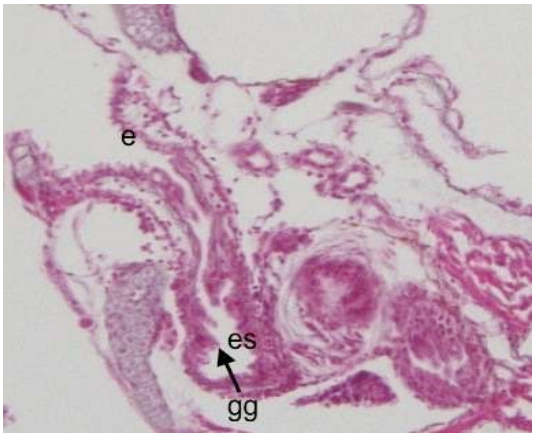


Fig. 8 Microfotografía de esófago (e) y estómago (es) funcionales, con la presencia de glándulas gástricas (gg), a los 9 DDE. 20x, Técnica H-E.

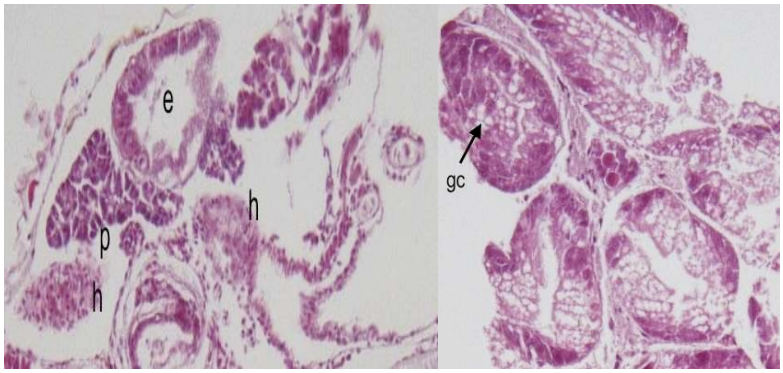


Fig. 9 Microfotografía de glándulas accesorias de larvas de sargo: hígado (h), páncreas (p) 20x y gránulos de zimógeno (gc), 40x, H-E.

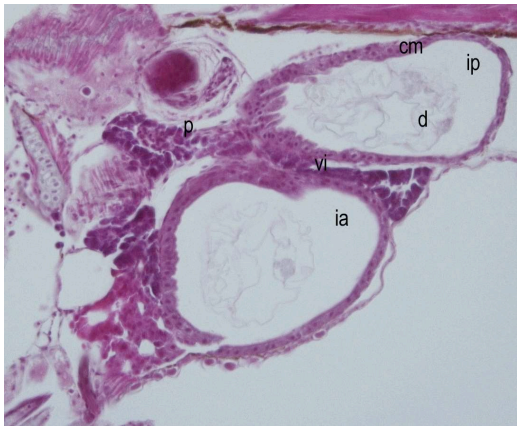
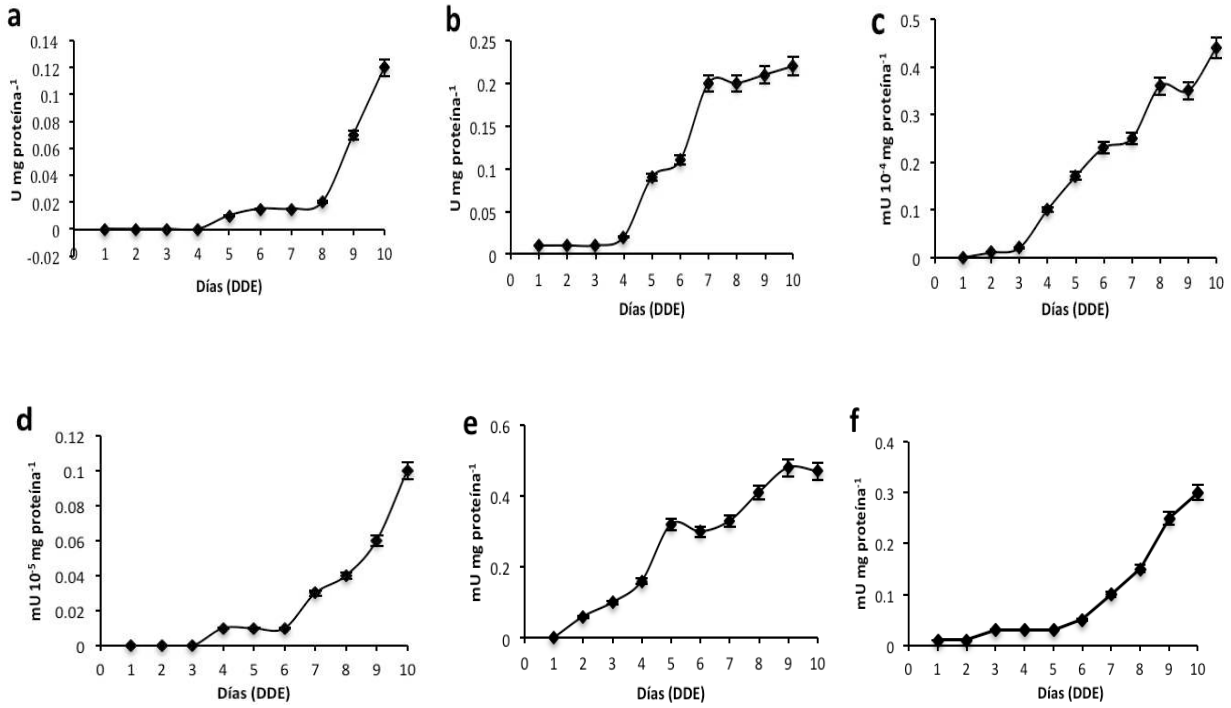


Fig. 10 Microfotografía del intestino anterior (ia) y posterior (ip), con su válvula intestinal (vi) que los conecta, páncreas acinar (p), células mucosas (cm) y desechos (d) de la digestión en el intestino posterior, 20x, Técnica H-E.

2.4.2 Actividad enzimática digestiva de larvas

Al compararse las actividades enzimáticas digestivas especificas entre las edades de las larvas, se detectaron en todas ellas diferencias significativas a partir del día 5 DE (proteasa ácida: F1 3, 0.05=433.1, p=0.00001; proteasa alcalina: F1 3, 0.05=31.2, p=0.0011; quimotripsina: F1 3, 0.05=75.4, p=0.0001; tripsina: F1 3, 0.05=89.7, p=0.00009; leucino aminopéptidasa: F1 3, 0.05=132.2, p=0.0003; carboxipéptidasa: F1 3, 0.05=70.7, p=0.0001; fosfatasa alcalina: F1 3, 0.05=85.9, p=0.0001; lipasa: F1 3, 0.05=905.8, p=0.0000 y amilasa: F1 3, 0.05=87, p=0.0000). La actividad específica de la proteasa ácida mostró niveles muy bajos en eleuteroembriones y en los primeros días de las larvas, aumentando gradualmente hasta el día 9 DE, registrando su

máxima actividad el día 10 DE (Fig. 11a). La actividad específica de las proteasas alcalinas se detectó desde el momento de la absorción del vitelo, con niveles bajos en eleuteroembriones y larvas hasta el día 5 DE, incrementó gradualmente y alcanzando su máxima actividad a partir del día 7 DE (Fig.11b). La actividad específica de tripsina inicia el día 4 DE, incrementó gradualmente, hasta alcanzar su valor máximo el día 10 DE (Fig.11c). La actividad específica de leucino aminopéptidasa inició el día 7 DE, incrementó su actividad gradualmente, alcanzó su valor máximo el día 10 DE (Fig.11d). La actividad específica de la carboxipéptidasa siguió un patrón similar al de las proteasas alcalinas, iniciando el día 5 DE, aumentó gradualmente su actividad y alcanzó su mayor actividad a partir del día 9 DE (Fig.11e). La actividad específica de quimotripsina aumentó ligeramente el día 7 DE, incrementó de manera gradual hasta el día 10 DE (Fig.11f). La actividad específica de amilasa presento un pequeño pico el día 5 DE, incrementó gradualmente a partir del día 7 DE, alcanzó su mayor actividad el día 10 DE (Fig. 11g). La actividad específica de la fosfatasa alcalina inicia con una leve actividad a partir del día 5 DE, se incrementó a partir del día 7 DE, alcanzó su máxima actividad el día 10 DE (Fig. 11h). Finalmente la actividad específica de lipasa (Fig. 11i) presento un patrón similar al de la fosfatasa alcalina.



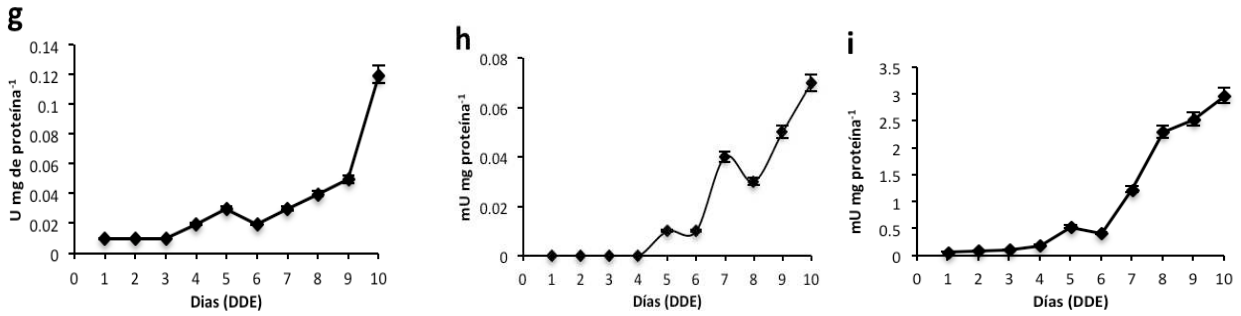


Fig. 11 Actividades enzimáticas digestivas específicas durante la ontogenia inicial del sargo *A. probatocephalus*: (a) Proteasa ácida (pepsina), (b) Proteasas alcalinas, (c) Tripsina, (d) Leucino aminopéptidasa, (e) Carboxipéptidasa, (f) Quimotripsina, (g) Amilasa, (h) Fosfatasa alcalina y (i) Lipasa, (promedio ±SD, n=3).

2.5 Discusión

El desarrollo morfo-funcional del tracto digestivo del sargo durante la ontogenia inicial, se describe desde un incipiente tubo recto con poca diferenciación, situado dorsalmente por arriba del saco vitelino. Durante la eclosión, la boca y el ano se encuentran cerrados como en algunas especies de peces marinos (Gisbert *et al*., 2004). Más tarde en los días 3 y 4 DE, acontece la abertura de la boca y se inicia el registro de la actividad de las proteasas alcalinas, antes de completa absorción del saco vitelino y la gota de aceite.

Conforme aumenta la edad de las larvas, experimentan intensos cambios en el tracto digestivo, durante el período de la alimentación endógena. Similares características morfológicas han sido descritas en un gran número de especies de peces (Moyano *et al*., 1996; Moyano *et al.,* 2005; Cara *et al.,* 2003; Álvarez González *et al.,* 2006, 2008; Gisbert *et al.,* 2009; Guerreiro *et al*., 2010; Jiménez-Martínez *et al.,* 2012), en este período, la larva desarrollará en general los órganos del sistema digestivo, aunque el desarrollo del estómago será diferente en cada especie (Lazo *et al*., 2011). Lo observado en el sargo es que, el estómago se desarrolló tempranamente, similar a lo reportado en larvas de curvina *Sciaenops ocellatus* (Holt *et al.,* 2007; Lazo *et al*., 2007), de róbalo asiático *L. calcarifer* (Walford & Law, 1993) y de róbalo blanco *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al*., 2012).

Uno de los primeros órganos del sistema digestivo en desarrollarse durante la ontogenia inicial es el hígado, debido al papel que juega en la reabsorción de vitelo, mientras que el páncreas y la vesícula biliar completan su diferenciación celular un poco más tarde, al iniciarse la alimentación exógena (Lazo *et al*., 2000; Gisbert *et al*., 2009), como se observo en el presente estudio. Así mismo, en los cortes histológicos de páncreas realizados en las larvas de sargo, se observaron gránulos de zimógeno acidofílicos (precursores de enzimas pancreáticas), detectados en el páncreas exócrino al día 3 DE, incrementándose su actividad al comenzar la alimentación exógena como lo señalan Ribeiro y colaboradores (1999) y Zambonino-Infante & Cahu (2001), resaltando también estos autores, la importancia de las secreciones pancreáticas, durante el período agástrico de las larvas.

La tendencia observada de las actividades específicas de proteasas alcalinas, tripsina y carboxipéptidasa durante los primeros días del desarrollo del sargo, es similar a la de otros peces como en *Sparus aurata* (Moyano *et al*., 1996), *Seriola lalandi* (Chen *et al*., 2006), *P. californicus* (Álvarez-González *et al*., 2006), *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al*., 2007) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al*., 2008), que sugieren que estas enzimas tienen un papel de suma importancia en la digestión de las larvas, previo a la funcionalidad del estómago (Moyano *et al*., 1996). Estos cambios en la actividad enzimática alcalina concuerdan con Cahu & Zambonino-Infante (1994), quienes observaron que las enzimas pancreáticas son responsables de la mayoría de la hidrólisis proteíca en el intestino, iniciando en la zona luminal y continuando luego en el epitelio parietal, antes de la absorción de nutrientes por los enterocitos.

Estas variaciones en la actividad de las proteasas alcalinas durante el desarrollo temprano del sargo, podrían estar asociadas a los cambios morfo-fisiológicos que acontecen, los cuales pueden incrementar la secreción de zimógeno pancreático, influenciado posiblemente por el tipo y cantidad de proteína del alimento, ya que, la primera alimentación exógena, después de la absorción del vitelo, puede activar la secreción de quimotripsina, lo que ocurrió en las larvas de sargo a los 7 días DE. Se ha detectado que esta enzima es una de las primeras exoproteasas alcalinas que actúa en el tracto digestivo (Hjelmeland *et al*., 1983). Por el contrario, en el sargo la actividad específica de tripsina, se detectó de manera temprana (día 4 DE), aumentando rápidamente. Existen registros de que esta enzima ha sido detectada tempranamente, antes de la

abertura de la boca y de la primera alimentación, está relacionada con la activación de zimógenos pancreáticos y con la hidrólisis de proteínas en larvas de *Solea senegalsis* y *P. olivaceus* (Kurokawa & Suzuki 1996; Saenz *et al.,* 2005).

La diferencia entre la actividad de tripsina y quimotripsina registrada en larvas de *A. probatocephalus*, puede ser considerada como un indicador nutricional, ya que normalmente, la cantidad de tripsina se incrementa en respuesta de la hidrólisis de proteínas; sin embargo, si las larvas son alimentadas con una dieta inadecuada, se produce relativamente menos tripsina contra una secreción constante de quimotripsina, disminuyendo esta proporción (Moyano *et al.,* 1996; Cara *et al*., 2003).

Referente a la carboxipéptidasa A en larvas de sargo, se detectó una baja actividad hasta el día 5 DE, alcanzando sus valores máximos a los 10 días DE. Esta enzima se ha estudiado principalmente en peces omnívoros como el sargo; *Cyprinus carpio* (Cohen *et al.,* 1981), *Parasilurus asotus* (Yoshinaka *et al*., 1985), *Scophthalmus maximus* (Munilla-Mora & Stark, 1990). Es la principal enzima pancreática, precursora de la digestión de péptidos en la luz intestinal, se inicia su secreción durante la primera alimentación (Srivastava *et al.,* 2002), como se puso de manifiesto en el presente estudio.

La actividad leucino aminopéptidasa registró valores bajos antes del día 5 DE, aumentando su actividad de manera progresiva hasta el día 10 DE. Este patrón coincide con lo reportado en el rodaballo, *S. maximus* (Cousin *et al.,* 1987) y la lubina europea, *Dicentrarchus labrax* (Cahu & Zambonino-Infante, 1997), que señalan que esta enzima se localiza como pro-enzima en las microvellosidades del enterocito, activándose por la acción de tripsina y/o quimotripsina, para la hidrólisis de péptidos con aminoácido N-terminal.

La actividad máxima de la proteasa ácida se observó entre el día 9 y 10 DE, similar a lo reportado en otras larvas de peces marinos de la familia esparidae como *D. sargus*, *D. dentex* y *P. auriga* (Alarcón *et al.,* 1998; Cara *et al.,* 2003; Moyano, *et al*., 2005). Por lo que, se puede considerar que las larvas de sargo por esta condición, podrían destetarse de manera temprana, alrededor de los 15 días DE, indicando probablemente el inicio de la madurez estomacal. Ya que valores adecuados de pepsina, indican la presencia de un estómago funcional con células gástricas y la

secreción de ácido clorhídrico, lo que podría considerarse como un indicador de la maduración del aparato digestivo (Baglole *et al.,* 1997; Kvale *et al,*. 2007; Lazo *et al,*. 2007).

La actividad específica de pepsina registrada en larvas de sargo a los 9 y 10 días DE, pone de manifiesto la acción secretora de las glándulas gástricas, presentes en el estómago, que reflejan el inicio de la madurez estomacal. Así como los incrementos sostenidos de las enzimas leucino-aminopéptidasa y fosfatasa alcalina, que son indicadores de una adecuado desempeño intestinal (Guerreiro *et al*., 2010). Dichas condiciones señalan la pauta del proceso de maduración digestiva, indicando el umbral de un estado de madurez del tracto digestivo de larvas de sargo a los 10 días DE, lo que sugeriría que esta especie estaría capacitada enzimáticamente para una deshabituación temprana (15 días DE).

CAPÍTULO 3

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE JUVENILES

3. 1 Resumen

Para comprender los procesos que permiten la alimentación en cualquier especie que se pretenda cultivar como el sargo, es de vital importancia la evaluación de la actividad enzimática digestiva, ya que de ellas depende la hidrólisis de los nutrientes durante la digestión. En el presente estudio se determinó la actividad enzimática digestiva en juveniles del sargo, se caracterizaron parcialmente sus proteasas y se determinó la digestibilidad *in vitro* de diferentes ingredientes alimenticios, por medio de técnicas bioquímicas y electroforéticas. Los resultados muestran mayores niveles de actividad en las proteasas estomacales (2.39 ± 0.02 Umg proteina^{-1}), comparados con los de las proteasas intestinales (1.6 ± 0.1 Umg protein^{-1}), también se registró la actividad de tripsina (0.45 ±0.02 Umg protein^{-1}), quimotripsina (0.64 ±0.1 Umg protein^{-1}), leucina aminopéptidasa (0.007 ±0.001 Umg protein^{-1}), carboxypéptidasa A (0.5 ±0.1 Umg protein^{-1}), amilasa (0.47 ±0.06 Umg protein^{-1}), lipase (0.45 ±0.05 Umg protein^{-1}), fosfatasa ácida (0.04 ±0.007 Umg protein^{-1}) y fosfatasa alcalina (0.38 ±0.02 Umg protein^{-1}). La temperatura óptima de las proteasas estomacales fue de 45 °C, mientras que la de las proteasas intestinales fue de 55 °C. El pH óptimo fue de 2 para las proteasas estomacales con alta estabilidad a condiciones ácidas, mientras que el pH óptimo para las proteasas intestinales fue de 9, mostrando una alta estabilidad en condiciones alcalinas. Las proteasas estomacales fueron inhibidas el 78 % con Pepstatin A, lo que indica la presencia de pepsina, como principal proteasa. El zimograma de proteasas estomacales reveló una sola banda con actividad proteasa, con Rf de 0.49, completamente inhibida por Peptatin A. El zimograma de proteasas intestinales reveló cuatro bandas (51.3, 34.9, 27.8 y 21.2 kDa). Todas las bandas se inhibieron con el TLCK, lo que muestra la presencia principalmente de serin proteasas tipo tripsina. Referente a la digestibilidad en vitro, se obtuvieron los valores más altos del grado de hidrólisis con la harina de cabeza de camarón (0.29), harina de res (0.17) y gluten de maíz (0.15). Los valores más altos en la cantidad de aminoácidos totales libres, se registraron también con la harina de cabeza de camarón (2028.8), harina de pollo (1865.3) y harina de res (1781.2). Se concluye que la digestión del

sargo, puede ser considerada de una especie carnívora con tendencia omnívora.

3. 2 Introducción

Para lograr el cultivo a escala comercial de cualquier especie incluida el sargo, es necesario comprender los aspectos nutricionales básicos que permiten el desarrollo de alimentos balanceados al menor costo posible. Por lo que, es de gran importancia estudiar los procesos fisiológicos digestivos, en los que el papel de las enzimas digestivas es vital, ya que son ellas las que llevan acabo la hidrólisis de los nutrientes durante la digestión (Scocco *et al*., 1997; Olsson & Holmgren, 2001).

El proceso digestivo en peces implica una gama de estímulos sensoriales, hormonales, mecánicos, así como la participación de la batería enzimática digestiva propia de la especie (Lundstedt *et al*., 2004). Dentro de las enzimas digestivas en el estómago, la proteasa ácida más importante es la pepsina, que es una enzima aspártica que actúa con mayor eficiencia en pHs ácidos, requiere que el residuo dos de la cadena peptídica sea tirosil, triptofanil o fenilalanil. En el intestino las enzimas funcionan a pH alcalino como la tripsina y la quimotripsina que son producidas en el páncreas y secretadas al lumen del intestino. Estas enzimas son del grupo de las endopéptidasas, caracterizadas por una tríada única de aminoácidos que son histidina, ácido aspártico y serina (Sunde, 2006).

En peces la digestión de las proteínas comienza principalmente en el estómago, donde la pepsina secretada por las glándulas gástricas y el ácido clorhídrico inician la desnaturalización, posteriormente en el intestino, con la acción de las enzimas pancreáticas e intestinales se realiza una hidrólisis selectiva esencial, dando como resultado final, la degradación transporte y absorción de los nutrientes (Tufan *et al.,* 2008). Esta actividad puede ser afectada por la calidad y cantidad de los nutrientes que componen la dieta, así como por la presencia de inhibidores en el alimento (Lazari *et al.,* 2010; Murashita *et al*., 2015).

La evaluación de la digestibilidad enzimática de los peces permite determinar el valor nutritivo de la fuente de proteína (Köprücü & Ozdemir, 2005). La calidad de una proteína dependerá de su composición en aminoácidos, así como, de la capacidad enzimática del organismo para

aprovecharla (Nankervis & Southgate, 2006). Por lo que un ingrediente alimenticio puede ser excelente por su composición química, pero tendrá poco valor, si no puede ser digerido y absorbido por la especie (Köprücü & Ozdemir, 2005).

Los estudios de fisiología digestiva son necesarios para el desarrollo de una formulación de dietas específicas, para determinar la cantidad y el tipo de ingredientes que se incorporarán a la dieta, que dependeran de la actividad enzimática presente en el sistema digestivo, particularmente en el caso de las proteasas, ya que las proteínas son los ingredientes más importantes en relación con los requisitos de energía y aminoácidos en los peces (Lazo *et al.*, 2007). El proceso de digestión en los peces, involucra varias enzimas responsables de la hidrólisis de las proteínas (Tufan *et al*., 2008), donde la actividad expresada depende de varios factores, como los hábitos de alimentación, tipo de alimento, entre otros (Kuz'mina & Strel ' Nikova, 2008). De esta forma, la caracterización de las proteasas digestivas, permite determinar las condiciones óptimas para que las enzimas alcancen su máxima actividad, y su estabilidad a diferentes condiciones de temperatura y pH (Simpson, 2000), además evaluar el efecto de inhibidores sobre su actividad (Falcon- Hidalgo *et al*., 2011; Unajak *et al*., 2012). Así mismo, la caracterización de las enzimas digestivas muestra el efecto de las condiciones fisicoquímicas, que nos permiten comprender el mecanismo de acción cinética de las enzimas de la especie de interés (García-Carreño *et al*., 1993; Klomklao *et al*., 2008; Álvarez-González *et al*., 2010).

Los estudios de caracterización de la proteasa digestiva se han llevado a cabo en diferentes especies de peces marinos como dorada *Sparus aurata* (Alarcón *et al*., 2001), atún del Atlántico *Thunnus thynnus* (Essed *et al*., 2002), pez lengua dura asiático *Scleropages formosus* (Natalia *et al*., 2004), sardina de Monterrey *Sardinops sagax caerulea* (Castillo-Yañez *et al*., 2005), lenguado de Senegal *Solea senegalensis* (Sáenz de Rodrigáñez *et al*., 2005), rodaballo *Scophthalmus maximus* (Hai-ying *et al*., 2006), atún del Pacífico *T. orientalis* (Matus-De la Parra *et al*., 2007), atún blanco *T. alalunga* (Nalinanon *et al*., 2010[a]), pargo rojo *Lutjanus guttatus* (Peña *et al*., 2015) y robalo común *Centropomus undecimalis* (Concha-Frías *et al*., 2016).

En estos estudios se ha demostrado que, las proteasas ácidas comúnmente presentan una actividad óptima entre pH 2 y 3 y temperaturas óptimas entre 35 y 65 °C. Por otro lado, la

mayoría de las proteasas alcalinas mantienen un pH óptimo entre 9 y 10, y una temperatura óptima de entre 45 y 65 ° C. En relación con los inhibidores, en algunas especies carnívoras, la actividad de las proteasas ácidas está totalmente inhibida por la pepstatina A, que representa actividad tipo pepsina. En contraste, la inhibición de las proteasas alcalinas es variable entre las especies, ya que están influenciadas por el ambiente y los hábitos de alimentación (Díaz-López *et al*., 1998; Falcon-Hidalgo *et al*., 2011). Algunos informes en ciertas especies de peces indican, que los cambios en la actividad enzimática específica varia a diferentes edades (Chiu & Pan, 2006; Falcon-Hidalgo *et al*., 2011; Peña *et al*., 2015).

Recientemente se ha empleado para medir el valor nutritivo de los alimentos, la técnica de pH-stat, ésta técnica es una herramienta valiosa, que simula mediante la digestibilidad *in vitro*, las condiciones del tracto digestivo de los organismos, considerando diferentes factores como el pH, la temperatura y el tiempo de residencia del alimento, permitiendo determinar el grado de hidrolisis por la acción de las enzimas digestivas del organismo (Ezquerra *et al*., 1997; Tibbetts *et al*., 2011; Yasumaru & Lemos, 2014; Peña *et al*., 2017). Esta técnica se emplea en la selección de ingredientes biodisponibles y digeribles que hagan más eficientes las dietas (García-Carreño *et al*., 2002; Fu *et al*., 2005; Furné *et al*., 2005), de tal manera que la asimilación de los nutrientes implica su digestibilidad o grado de hidrólisis, en función de la capacidad digestiva del pez (Moyano *et al*., 1998; Fu *et al*., 2005). Oña y colaboradores, (2003), señalan que las diferencias en los valores de hidrólisis entre las distintas fuentes de proteína, podría estar influenciada por dos principales factores: primero su perfil de aminoácidos; donde las enzimas ácidas hidrolizan enlaces peptídicos en aminoácidos ácidos y aromáticos, donde la proporción de estos aminoácidos condiciona su grado de hidrólisis, y segundo: la característica de su estructura terciaria, que se relaciona directamente con la accesibilidad y su estructura tridimensional.

En este estudio se presenta la evaluación de la actividad ezimática digestiva de juveniles de sargo, la caracterización parcial de sus proteasas y la evaluación de la digestibilidad *in vitro* de diferentes ingredientes alimenticios, para su aplicación en la selección de ingredientes para la elaboración de dietas prácticas.

3.3 Material y métodos

3.3.1 Preparación de extractos multienzimáticos

Los extractos multienzimáticos se prepararon a partir de cinco juveniles silvestres de sargo (con un peso promedio de 100 ± 10 g), capturados en la laguna de Alvarado, Ver. Los peces se sacrificaron por medio de un choque térmico con agua helada. El peso de los organismos se registró con una balanza digital Ohaus® (0,01 g, Shenzhen, China) y la longitud total con un ictiómetro. La extracción del estómago y del intestino se realizó en condiciones de frío (4 ºC), registrando el peso de cada órgano, posteriormente se congelaron y liofilizaron. Cada órgano se procesó por separado en una proporción de 1:30 (peso: volumen), homogeneizándose con un triturador de tejidos IKA (MCA T18 basic Ultraturrax). Los estómagos se homogeneizaron en 100 mmol L^{-1} de tampón glicina-HCl a pH 2 y los intestinos en 30 mmol L^{-1} Tris-HCl + 12.5 mmol L^{-1} de tampón $CaCl^2$ a pH 7.5. Los homogeneizados se centrifugaron a 14,000 g durante 30 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. La concentración de proteína soluble en los extractos enzimáticos de estómago y de intestino se determinó con la técnica descrita por Bradford (1976). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

3.3.2 Análisis de actividad enzimática digestiva

La actividad proteasa ácida se determinó utilizando la técnica descrita por Anson (1938), utilizando hemoglobina bovina al 1 % como sustrato en 100 mmol L^{-1} de tampón glicina-HCl a pH 2. La actividad de proteasa alcalina se determinó con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984), utilizando caseína al 1 % como sustrato en 100 mmol L^{-1} Tris-HCl, 10 mmol L^{-1} de tampón $CaCl^2$ a pH 9. Una unidad (U) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produjo 1 μmol de producto liberado (tirosina) por minuto, se determinó la hidrólisis de hemoglobina y caseína a 280 nm, se usó el coeficiente de extinción molar de tirosina (0.005 ml $\mu g^{-1}cm^{-1}$) para ambas proteasas.

La actividad de tripsina se evaluó con la técnica descrita por Erlanger *et al.,* (1961), usando 1 mmol L^{-1} de hidrocloruro de Nα-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida (BAPNA) como sustrato en 100 mmol L^{-1} Tris-HCl, 10 mmol de tampón L^{-1} $CaCl^2$ a pH 8, una unidad (U) de actividad

enzimática se definió como la cantidad de enzima que producía 1 μmol de p-nitroanilina por minuto, utilizando un coeficiente de extinción molar de 8.8 ml $\mu mol^{-1}cm^{-1}$. La actividad de la quimotripsina se determinó con la técnica propuesta por Del Mar *et al*. (1979), usando como sustrato 0.1 mmol L^{-1} de SAAPNA (N-succinil-ala-pro-phe p-nitroanilida) en 100 mmol L^{-1} Tris-HCl, 10 mmol L^{-1} $CaCl^2$ buffer a pH 7.8, se definió una unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que producía 1 μmol de p-nitroanilida liberada por minuto, usando un coeficiente de extinción molar de 0.906 ml /mol / $1cm^{-1}$.

La actividad de la leucino-aminopéptidasa se determinó con la técnica propuesta por Maroux *et al.,* (1973), usando 1 mmol L^{-1} de p-nitroanilida de leucina como sustrato en 50 mmol de tampón de fosfato de sodio monobásico L^{-1} a pH 7.2, una unidad (U) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que producía 1 μmol de alanina p-nitroanilina liberada por minuto, con un coeficiente de extinción molar de 8.2 mL $\mu mol^{-1}cm^{-1}$. La actividad de carboxipeptidasa A se determinó con el método descrito por Folk y Schirmer (1963), utilizando 1 mmol L^{-1} de hipuril-L-fenilalanina como sustrato en 25 mmol L^{-1} tris-HCl, 50 mmol L^{-1} NaCl de solución buffer a pH 7.5, una unidad (U) de actividad enzimática, se definió como la cantidad de enzima que producía 1 μmol de ácido hipúrico por minuto, con un coeficiente de extinción molar de 0.36 ml $\mu mol^{-1}cm^{-1}$. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado, las determinaciones de actividad enzimática se calcularon con las siguientes fórmulas:

Actividad total (Unidades ml^{-1}) = [Δabs * volumen final de reacción (ml)] / [MEC * tiempo (min) * volumen de extracto (ml)].

Actividad específica (Unidades mg $prot^{-1}$) = Actividad total / proteína soluble (mg), donde Δabs representa el aumento en la absorbancia, y MEC representa el coeficiente de extinción molar respectivo.

La actividad de α-amilasa se determinó con la técnica propuesta por Robyt y Whelan (1968) usando como sustrato almidón al 2 %, en solución fosfato de sodio y citrato de sodio 100 mM + NaCl 50 mM pH 7.5. La actividad de lipasa se determinó con la técnica descrita por Versaw *et al.,* (1989), utilizando como sustrato β-naftil caprilato a 100 mM. Las actividades fosfatasa ácida y alcalina se determinaron con la técnica de Bergmeyer (1974), con el sustrato 4-nitrofenilfosfato

2 % en una solución de ácido cítrico/citrato a pH 5.5 para condiciones ácidas y glicina-NaOH 100 mM a pH 10.1 para condiciones alcalinas.

3.3.3 Efecto del pH y la temperatura en las proteasas digestivas

El pH óptimo de las proteasas ácidas y alcalinas se evaluó en un rango de 2 a 12, usando la solución universal de Stauffer (1989), con la técnica de Anson (1938) y Walter (1984), respectivamente. Para la determinación de la estabilidad del pH, los extractos multienzimáticos se preincubaron (25 °C) a diferentes pH, a intervalos de tiempo de 0, 30, 60 y 90 min. La temperatura óptima de las proteasas ácidas y alcalinas se determinó con diferentes temperaturas de incubación, en un rango de 25 a 65 °C considerando intervalos de 10 °C, con las técnicas descritas por Anson (1938) y Walter (1984), respectivamente. Para determinar la estabilidad de las proteasas en diferentes temperaturas, los extractos de multienzimas fueron preincubados en diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55, 65 °C), por 0, 30, 60 y 90 minutos, usando el tiempo 0 min (sin preincubar) como control, la actividad residual se expresó como porcentaje. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

3.3.4 Efecto de inhibidores en la actividad de las proteasas

El efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasa, se realizó utilizándo diferentes inhibidores específicos: se empleó 1 mmol L^{-1} del inhibidor de Pepstatina A para las proteasas ácidas, se determinó su actividad residual con la técnica de Anson (1938) previamente descrita. Para las proteasas alcalinas, se usaron los inhibidores específicos siguiendo la técnica propuesta por García-Carreño *et al.,* (1993), 5 mmol L^{-1} tosil-fenilalanil-clorometil cetona (TPCK), 10 mmol L^{-1} fenantrolina (PHE), 10 mmol L^{-1} ácido tetraacético etil-diamina (EDTA), 10 mmol L^{-1} tosil-lisil-clorometil-cetona (TLCK), 250 mmol de inhibidor de tripsina de soya L^{-1} (SBT1), 100 mmol de fluoruro de L^{-1} fenil metilsulfonilo (PMSF) y 250 mmol L^{-1} del inactivador ovoalbúmina (OVO). La actividad residual de las proteasas alcalinas se evaluó con la técnica de Kunitz (1947), modificada por Walter (1984) previamente descrita. En ambos ensayos, se utilizó una muestra control sin inhibidor, la actividad residual se expresó como porcentaje, todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.3.5 Análisis de zimogramas

Los análisis electroforéticos se realizaron con una cámara para electroforesis Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad), con cuatro placas que contenían geles verticales (8x10x0.075 cm) con una capacidad de muestra de 10 ml por placa. Para el análisis de las proteasas ácidas del estómago, la electroforesis se realizó bajo condiciones nativas no desnaturalizantes (Native-PAGE), usando un gel de acrilamida continuo (10%) en tampón Tris (25 mmol L-^{1}) y glicina (192 mmol L^{-1}, pH 8.3, 80 voltios) de acuerdo con Davis (1964). Para el análisis de las proteasas alcalinas, la placa se preparó con un gel con 4% de poliacrilamida (PAA) en la parte superior y con un gel de corrimiento con 10% de PAA. La electroforesis se realizó en condiciones de desnaturalización (SDS-PAGE), con SDS en tampón Tris al 0.1% (25 mmol L^{-1}) y glicina (192 mmol L^{-1}, pH 8.3, 100 voltios), según Laemmli (1970), modificado por García-Carreño *et al.,* (1993). Los geles se trataron para revelar isoformas de proteasas de acuerdo con la técnica propuesta por Díaz-López *et al.,* (1998), se lavaron e incubaron durante 30 min a 5 °C en una solución de caseína al 0.5 % (tampón Tris-HCl 100 mmol L^{-1}, pH 9), luego se incubaron los geles durante 90 min en la misma solución a 37 ºC, y posteriormente se lavaron y fijaron en solución de ácido tricloroacético (12 %) durante 15 min. Después de que se detectaron bandas de actividad enzimática, se tiñeron siguiendo la técnica propuesta por Weber & Osborn (1969), usando una solución de Cromassie azul brillante R-250 al 0.1 %, mientras que la decoloración, se llevó a cabo en una solución 35:10:55 de metanol-ácido acético-agua. Las zonas claras revelaron la actividad de las proteasas en pocos minutos, aunque se obtuvieron zonas bien definidas después de 4 h.

La electroforesis se complementó con el uso de inhibidores específicos previamente mencionados, de acuerdo con el método descrito por Dunn (1989). Los extractos multienzimáticos se preincubaron durante 1 h con cada inhibidor (1: 1 v / v), y se aplicaron a cada SDS-PAGE (5 µl por pocillo). Se usó un marcador de peso molecular: BM523 (Bio Basic Inc; fosforilasa de conejo B 96.7 kDa, albúmina sérica bovina 66.2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 31.0 kDa, inhibidor de tripsina la soya 21.5 kDa y lisozima 14.4 kDa). La electromovilidad relativa (Rf) se calculó para los zimogramas de acuerdo con Igbokwe & Downe (1978). El peso molecular (MW) de cada banda en el SDS-Zymogram (proteasas alcalinas) se

calculó utilizando una relación ajustada linealmente entre el Rf y el log^{10} de los marcadores MW de proteínas, utilizando el programa de software Quality One versión 4.6.5 (Hércules, CA) .

3.3.6 Análisis del grado de hidrólisis (GH %)

El grado de hidrólisis de las proteasas digestivas se determinó utilizando el equipo de pH- STAT (Metrohom, Titrino 718, Suiza). En un vaso de 20 ml se preparó una solución acuosa con 8 mg de proteína ml^{-1} de los siguientes productos alimenticios:

Harina de carne de pescado con 72 % de proteína, proveniente de Alimentos de alta calidad "El Pedregal S.A. de C.V.", Edo. de México.

Harina de cabeza de camarón con 55.3 % de proteína, proveniente de Proteínas marinas y agropecuarias S.A de C. V, Guadalajara, Jalisco.

Harina de pasta de soya con 49.3 % de proteína, proveniente de Alimentos de alta calidad "El Pedregal S.A. de C.V.", Edo. de México.

Harina de pollo con 65 % de proteína, National Renderers Association, México D.F.

Harina de carne de res con 48.7% de proteína, proveniente de Alimentos de alta calidad "El Pedregal S.A. de C.V.", Edo. de México.

Harina de gluten de trigo con 75 % de proteína, proveniente de Gluten y Almidones industriales S.A. de C.V., México D.F.

Harina de gluten de maíz con 60 % de proteína, proveniente de Droguería Cosmopolita S.A de C. V., México D.F.

Las determinaciones se realizaron siguiendo la técnica propuesta por Saunders *et al*. (1972). Utilizando para la evaluación del grado de hidrólisis ácidos, los extractos de estómago. Se tomó el valor obtenido con la hemoglobina como el 100 %, la cual cuenta con un porcentaje de proteína cruda del 90 % (US Biological, United States Biological, No. de catálogo 1850). Para la evaluación del grado de hidrólisis alcalinos, se emplearon los extractos de intestino. Se tomó el

valor obtenido con la caseína como el 100 %, la cual cuenta con un porcentaje de proteína cruda del 90 % (Research Organic, Probiotec, No. de catálogo1082C). Para las proteasas ácidas se ajustó el pH a 3.5 con HCl 0.1 N, agregando 80 µl (25 U/ml) del extracto multienzimático a pH 3, manteniendo la mezcla en constante agitación, a temperatura de 37 °C por 15 min. Para la reacción alcalina, se ajusto el pH a 7.8 con NaOH 0.1N, agregando 100 µl del extracto multienzimático (17 U ml^{-1}) a pH de 8, con agitación continua, a 37 °C por 45 min. Concluida la digestión, se calculó el grado de hidrólisis con base en el volumen de NaOH 0.1 N requerido para mantener el pH en 8 en las reacciones alcalinas, así como el volumen de HCl 0.1 N requerido para mantener el pH a 3.5 en las reacciones ácidas. Así mismo, se evaluó el grado de autohidrólisis de los ingredientes en ausencia de las enzimas digestivas, agregando un volumen equivalente de agua destilada, para conformar los ensayos control. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Se expresó el grado de hidrólisis (GH %), como el porcentaje de los enlaces peptídicos hidrolizados (H) respecto al total de la proteína (h_{tot}), se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde H es el número de enlaces peptídicos hidrolizados, y h_{tot} los enlaces peptídicos totales de la proteína. El valor de H se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$H = VB \times NB \times \alpha\ MP$$

Donde:

VB= es el volumen en ml de la base o ácido consumido
NB= es la normalidad de la base o ácido
α = es la constante de disociación de los grupos α-NH^2
MP= es la masa de proteína en la mezcla de reacción

Durante las determinaciones del grado de hidrólisis, al adicionar el extracto estomacal durante la digestión ácida, se colectaron muestras (40 µl) de la mezcla hidrolizada a los 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600,700, 800 y 900 segundos. De igual manera, durante la digestión alcalina después de

adicionar el extracto intestinal se tomaron muestras (40 µl) a los 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500 y 2700 segundos, para su posterior análisis.

3.3.7 Análisis de aminoácidos totales libres

Para la determinación de aminoácidos totales libres, se tomaron 20 µl de la solución acuosa hidrolizada y se fijaron con 20 µl de TCA al 12 %, siguiendo la técnica propuesta por Church y colaboradores (1983), que se basa en la unión de la parte amino terminal con el reactivo de *o*-ftaldialdehído (OPA). La solución de OPA fue preparada con 50 ml de tetraborato sódico 0.1 M, 5 ml de SDS al 20 %, 80 mg de *o*- ftaldialdehído, disueltos en 1 ml de metanol y 0.2 ml de ß-mercaptoetanol, aforado con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

Las muestras obtenidas fueron centrifugadas por 15 min (14 000 rpm). Se tomaron 10 µl del sobrenadante y se agregó 1 ml del reactivo OPA, mezclado e incubado durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbancia a 340 nm, comparando con un estándar con concentraciones crecientes de 0 a 20 µg ml^{-1} de L-leucina (0.5 mg ml^{-1}), para determinar en las muestras los aminoácidos libres totales, los cuales se expresaro como µg de equivalentes de L-leucina liberados por µg de proteína. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.3.8 Análisis estadístico

Se verificó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Chakravarti *et al.,* 1967) y la homocedasticidad con la prueba de Levene (Hotelling, 1988). Cuando los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se empleó un análisis de ANOVA de una vía, con una prueba a posteriori de Tukey. Si no cumplieron con estos supuestos, se empleó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba posteriori de Nemenyi (Hollander & Wolfe, 1999). Para comparar el efecto de los inhibidores y los grados de hidrólisis los datos fueron transformados con la función arcoseno para su análisis. Las diferencias se consideraron significativas a $P< 0.05$. Todas las pruebas se llevaron a cabo con el software Statistica (v. 7.1 Stat Soft, Tulsa, OK, USA).

3.4 Resultados

3.4.1 Actividad enzimática digestiva

La actividad de las proteasas ácidas (2.39 ± 0.02 U mg de proteína^{-1}), fue mayor que la actividad de la proteasa alcalina (1.6 ± 0.1 U mg de proteína^{-1}). También se determinó la actividad de otras enzimas endopéptidasas alcalinas tales como: la tripsina y la quimotripsina y las exopéptidasas: leucina aminopéptidasa y carboxipéptidasa A. Así mismo, se determinó la actividad α amilasa, lipasa y fosfatasas ácida y alcalina, los valores de la actividad de estas enzimaas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1 Actividades de enzimas digestivas registradas en extractos multienzimáticos de estómago e intestino de juveniles de sargo, promedio ± SD, (n=5).

Enzima	**Actividad (U mg proteína^{-1})**
Proteasas ácidas	2.39 ± 0.02
Proteasas alcalinas	1.6 ± 0.1
Tripsina	0.45 ± 0.02
Quimotripsina	0.64 ± 0.1
Carboxipéptidasa A	0.5 ± 0.1
Leucina aminopéptidasa	0.007 ± 0.001
α Amilasa	0.47 ± 0.06
Lipasa	0.45 ± 0.05
Fosfatasa ácida	0.04 ± 0.007
Fosfatasa alcalina	0.38 ± 0.02

3.4.2 Caracterización parcial de proteasas

El pH óptimo para la actividad de la proteasa ácida fue de 2 (Fig. 1a), se registró diferencia significativa (F1 10, 0.05=80.2, p=0.0000), entre este valor y el resto de pHs. La estabilidad a los cambios de pH fue mayor entre los pH 2 y 4, en comparación con la estabilidad observada en los otros valores de pH (Fig. 1b). La actividad residual de las proteasas ácidas se mantuvo alrededor del 100 % en los pH 2 y 4, hasta los 90 minutos de preincubación, mientras que el resto del pH disminuyó después de 30 minutos de preincubación. Para la actividad de proteasa alcalina, se observó que el pH óptimo fue de 9, se registró diferencia significativa (F1 4, 0.05=74.1, p=0.0000), entre este valor y el resto de pHs (Fig. 1c), con una mayor estabilidad a los cambios de pH. Se registró con los pHs de 10 y 12 una actividad residual superior al 130 % hasta los 90 minutos de preincubación. Así mismo, para el pH 8 se detectó una actividad residual del 100 % hasta los 90 minutos de preincubación (Fig. 1d).

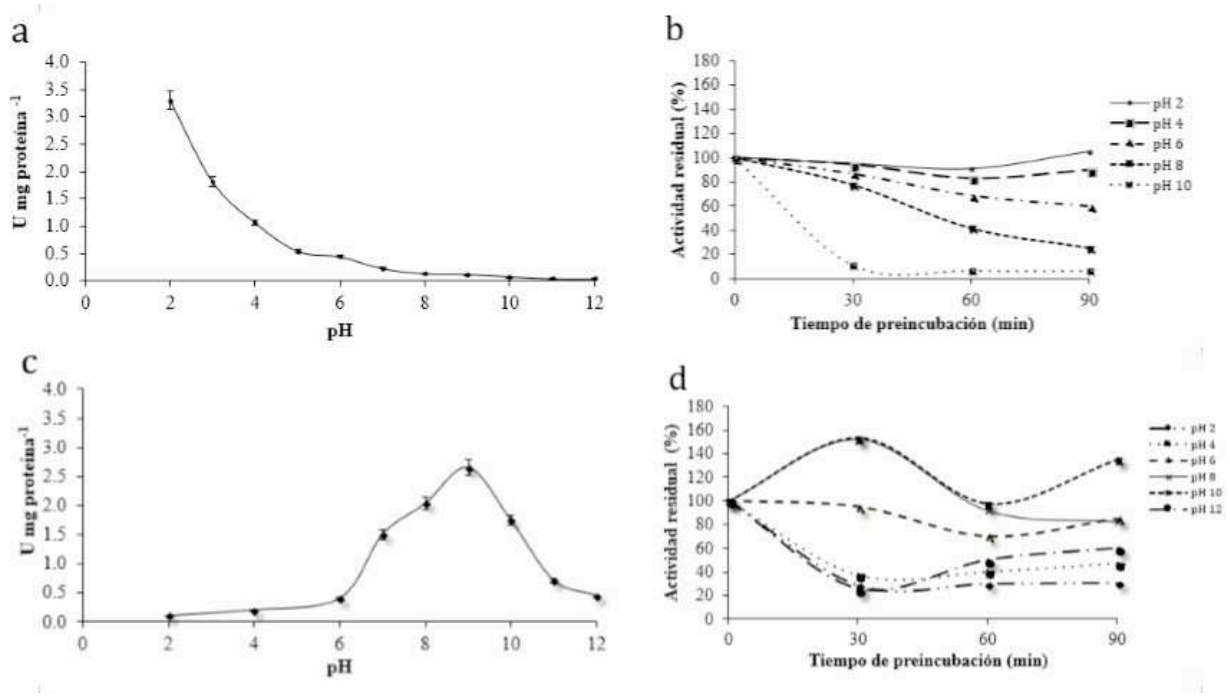


Fig. 1. Efecto del pH en las proteasas digestivas de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*): (a) pH óptimo de proteasas ácidas, (b) Estabilidad al pH de las proteasas ácidas, (c) pH óptimo de proteasas alcalinas, (d) Estabilidad al pH de las proteasas alcalinas.

La temperatura óptima de la proteasa ácida fue de 45 °C, registrando diferencia significativa (F1 5, 0.05=27.6, p=0.00003) con el resto de temperaturas (Fig. 2a). Asi mismo, se registró una mayor estabilidad a 25 °C, con un valor del 100 % de actividad hasta los 90 minutos de preincubación. La estabilidad de las proteasas ácidas se redujo al 90 % a temperaturas de 55 y 65 °C, después de 30 minutos de preincubación (Fig. 2b). La temperatura óptima de la proteasa alcalina fue de 55 °C (Fig. 2c), se registro diferencia significativa (F1 5, 0.05=147, p=0.0000) con esta temperatura y el resto de temperaturas. Se registró una mayor estabilidad entre los 25 y 45 °C, se registró una actividad del 115 % hasta los 90 min de preincubación. Finalmente, la estabilidad de la proteasa alcalina se redujo en un 90 % a 65 °C, después de 30 minutos de preincubación (Fig. 2d).

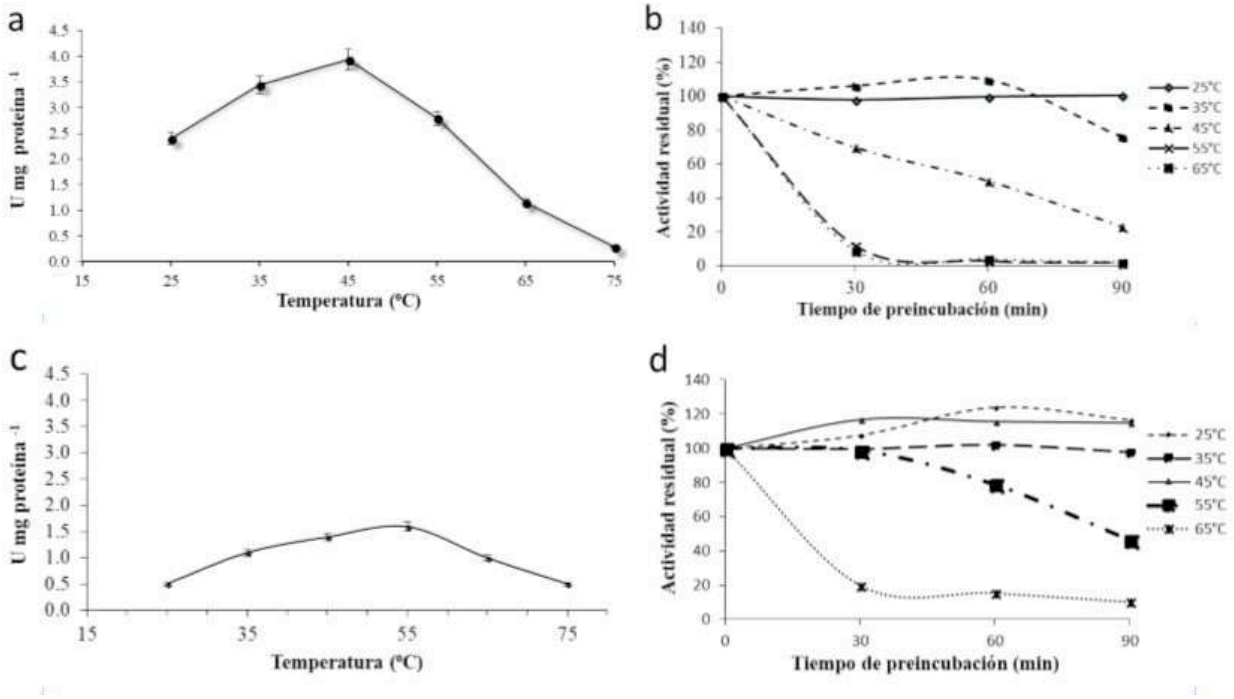


Fig. 2 Efecto de la temperatura en las proteasas digestivas de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*): (a) Temperatura óptima de proteasas ácidas, (b) Estabilidad a la temperatura de las proteasas ácidas, (c) Temperatura óptima de proteasas alcalinas, (d) Estabilidad a la temperatura de proteasas alcalinas.

La prueba con inhibidores indica que la actividad de la proteasa ácida fue inhibida en un 79 % por la pepstatina A. La actividad de proteasas alcalinas mostró que el 30 % de la actividad total fue inhibido por TPCK, mientras que la TLCK inhibió el 75 %. Ovalbúmina inactivó el 61 %, SBT1 inhibió el 70 % y PMSF inhibió el 45 %. Los quelantes como PHEN y EDTA inhibieron el 23 % y 7 %, respectivamente (Fig. 3), se presentó diferencia significativa entre los diferentes inhibodores (F1 7, 0.05=286, p=0.0000). La electroforesis bajo condiciones de PAGE nativa reveló una banda con actividad de proteasa ácida, con una electromovilidad relativa (Rf) de 0.49, esta banda se inhibió completamente por Pepstatin A (Fig. 4). En el análisis de electroforesis en SDS-PAGE de proteasas alcalinas sin inhibidor, se revelaron cuatro bandas con pesos moleculares que varían de 21.2 a 51.3 kDa (figura 5). La presencia de ovoalbúmina inhibió la banda 51.3 kDa, el SBTI inhibió dos bandas (21.2 y 27.8 kDa), mientras que TLCK inhibió todas las bandas. Por el otro lado PMSF, TPCK, PHEN y EDTA no inhibieron ninguna banda.

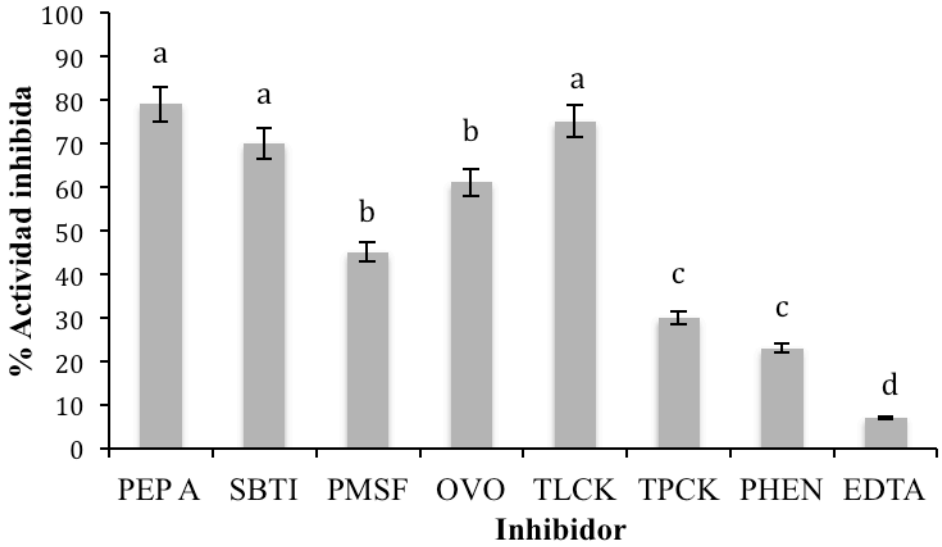


Fig. 3 Efecto en la reducción de la actividad de las proteasas digestivas en extractos multienzimáticos de juveniles de *A. probatocephalus* con diferentes inhibidores: inhibidor de la pepsina: pepstatina A (Pep A). Inhibidores de la serina proteasa e inactivador: inhibidor de la tripsina de soya (SBTI), fenil metilsulfonilo fluoruro (PMSF) y ovoalbúmina (OVO), inhibidor de tripsina: tosil-lisil-clorometil cetona (TLCK), inhibidor de quimotripsina: tosil-fenilalanil-clorometil cetona (TPCK). Inhibidor de metaloproteasas: fenantrolina (PHEN), ácido etil-diamina

tetraacético (EDTA). Los valores se expresan como porcentaje de inhibición frente a un ensayo control sin inhibidor, las barras indican valores de desviación estándar (Tukey, P <0,05).

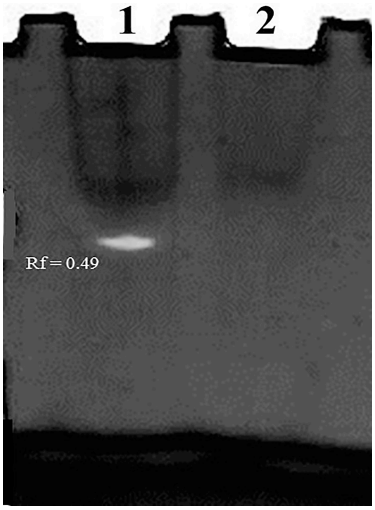


Fig. 4 Zimograma de proteasas ácidas a partir de extractos multienzimáticos de *A. probatocephalus*. Extracto multienzimático crudo (1), extracto multienzimático crudo más inhibidor Pepstatin A (2).

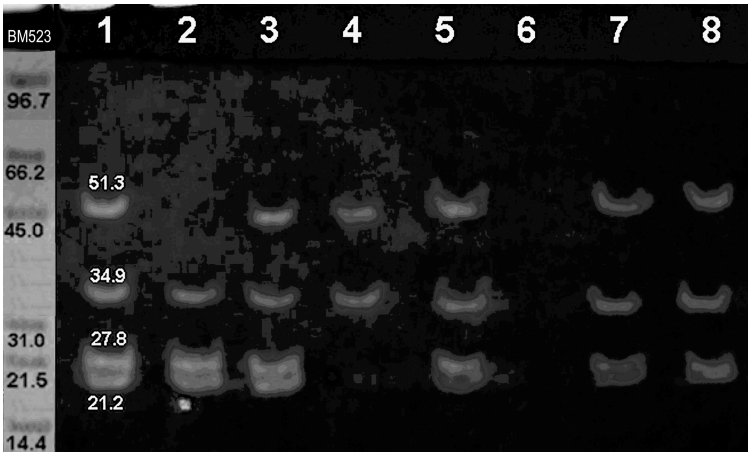


Fig. 5 Zimograma en SDS-PAGE de proteasas alcalinas de juveniles de *A. probatocephalus*: BM523 (marcador de peso molecular Bio Basic Inc; fosforilasa de conejo B 96.7 kDa, albúmina de suero bovino 66.2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 31.0 kDa tripsina, inhibidor de soya 21.5 kDa y lisozima 14.4 kDa), Control (1); inhibidores: OVO (2), PMSF (3), SBT1 (4), TPCK (5), TLCK (6), PHEN (7) y EDTA (8).

3.4.3 Digestibilidad *in vitro*

A partir de la exposición de los extractos multienzimáticos de estómago de juveniles de sargo a diferentes harinas animales y vegetales, con la técnica del pH STAT, en la Tabla 2 se muestran los grados de hidrólisis finales de las harinas evaluadas, se observó que la harina de cabeza de camarón presentó un grado de hidrólisis mayor que el de la hemoglobina (117.1 %), seguida por la harina de carne de res (70.2 %) y la harina de gluten de maíz (62.3 %), se presentaron diferencias significativas entre ellas (F1 7, 0.05=495.7, p=0.0000), siendo la harina de gluten de trigo la que presentó el valor más bajo de grado de hidrólisis (27.3 %).

Tabla 2 Valores de grado de hidrólisis (GH) y digestibilidad *in vitro* (%) de diferentes harinas con extractos multienzimáticos preparados con estómagos e intestinos de juveniles de sargo.

Ingredientes	GH Ácido	GH Alcalino	GH Total	Digestibilidad (%)
Hemoglobina/Caseína	0.1084 ± 0.01	0.1466 ± 0.01	0.2551^{b}	100
H. pasta soya	0.0387 ± 0.00	0.0886 ± 0.00	0.1260^{d}	49.4
H. Carne de pollo	0.0665 ± 0.00	0.0867 ± 0.00	0.1525^{d}	59.7
H. Carne de res	0.0734 ± 0.00	0.1056 ± 0.00	0.1791^{c}	70.2
H. Carne de pescado	0.0455 ± 0.00	0.1045 ± 0.00	0.1501^{d}	58.8
H. Gluten de Trigo	0.0425 ± 0.01	0.0276 ± 0.00	0.0697^{e}	27.3
H. Cabeza de camarón	0.0736 ± 0.00	0.2256 ± 0.00	0.2987^{a}	117.1
H. Gluten de Maíz	0.0738 ± 0.00	0.0868 ± 0.01	0.1590^{c}	62.3

Superíndices diferentes señalan diferencia significativa (Tukey, P <0,05).

3.4.4 Aminoácidos totales libres

Durante el proceso de degradación de las proteínas de los ingredientes alimenticios evaluados, se observó que, la degradación fue mayor con las enzimas alcalinas que con las ácidas. En las ácidas se obtuvieron los valores mayores con la harina de carne de pescado, seguida por la harina de carne de res y la harina de carne de pollo, y con las enzimas alcalinas se obtuvieron los valores mayores con la harina de cabeza de camarón, seguida por la harina de carne de pollo y harina de

carne de res. Finalmente, la harina que presentó los valores mayores de aminoácidos totales libres fue la harina de cabeza de camarón, seguida por la harina de carne de pollo y la harina de carne de res, con diferencia significativa entre ellas (F1 7, 0.05=2296, p=0.0000), como se señala en la Tabla 3.

Tabla 3 Valores de aminoácidos totales libres obtenidos con extractos multienzimáticos de juveniles de sargo con diferentes ingredientes alimenticios.

Ingredientes	**Ácidas µg ml^{-1}**	**Alcalinas µg ml^{-1}**	**Total µg ml^{-1}**
Hemoglobina/Caseína	1384.2 ± 6.2	1188.5 ± 6.2	2572.7^{a}
H. pasta soya	328.5 ± 1.3	791.5 ± 7.2	1120.1^{d}
H. Carne de pollo	430 ± 21.9	1434.5 ± 13	1865.3^{c}
H. Carne de res	433.1 ± 9.5	1348.1 ± 6.8	1781.2^{c}
H. Carne de pescado	556.5 ± 0.0	907.9 ± 10.3	1464.4^{d}
H. Gluten de Trigo	247.6 ± 10.2	605.2 ± 11.9	852.9^{e}
H. Cabeza de camarón	404 ± 5.4	1624.7 ± 4.1	2028.8^{b}
H. Gluten de Maíz	417.4 ± 0.4	972.3 ± 5.9	1389.8^{d}

Superíndices diferentes señalan diferencia significativa (Tukey, P <0,05).

3.5 Discusión

Los resultados muestran que los juveniles de sargo exhiben una mayor actividad en las proteasas ácidas en comparación con las proteasas alcalinas. Esto indica que, los juveniles de esta especie tienen hábitos carnívoros, similares a otros peces como dorada *S. aurata* (Alarcón *et al*., 2001), lengua dura asiática *S. formosus* (Natalia *et al*., 2004), dentón común *Dentex dentex* (Alarcón *et al*., 1998), lenguado de Senegal *S. senegalensis* (Saénz *et al*., 2005) y robalo común *C. undecimalis* (Conchas-Frias *et al*., 2016), que muestran una alta actividad de la pepsina en el estómago y una menor actividad de proteasas en el intestino, donde se lleva a cabo la parte final del proceso de hidrólisis, liberando péptidos y aminoácidos, que posteriormente son absorbidos por los enterocitos (Yúfera & Darias, 2007).

Se sabe que algunas especies pasan de un hábito carnívoro a un hábito omnívoro o herbívoro durante su desarrollo (Sedberry, 1987), que es el caso del sargo, cuya dieta consiste generalmente de invertebrados, principalmente crustáceos y plantas (Castillo-Rivera *et al*., 2007). Sin embargo, los juveniles de más de 50 mm de largo consumen invertebrados de caparazón duro (Jennings, 1985), lo cual explica, los valores altos de la digestibilidad *in vitro* y de aminoácidos totales liberes obtenidos con la harina de cabeza de camarón, lo cual parece indicar que, los juveniles de sargo poseen las enzimas digestivas necesarias para una adecuada hidrólisis de este material alimenticio. Teniendo en cuenta lo anterior, cabe señalar que, en el presente estudio se utilizaron organismos de 100 gramos de peso, durante esta etapa la especie tiene una tendencia carnívora, de acuerdo con difrentes autores (Springer & Woodburn 1960; Sedberry, 1987), lo que explica los altos valores de actividad de las proteasas ácidas en comparación con las proteasas alcalinas.

También se observó que, el sargo tiene un estómago con una estructura definida, que secreta proteasas ácidas que requieren un pH de 2 para una actividad máxima, similar a la reportada para otros peces de la familia Sparidae tales como; *S. aurata*, *D. dentex* (Alarcón *et al*., 1998), *D. puntazo* (Tramati *et al*., 2005). El valor del pH donde se encuentra una actividad óptima, se relaciona con el pH donde el centro activo de la enzima presenta una conformación iónica adecuada, para llevar a cabo la catálisis con gran eficiencia (Álvarez-González *et al*., 2010). En este sentido, la actividad óptima encontrada para las proteasas ácidas fue pH 2, que coincide con informes de otras especies como en *Siluru glanis* (Jonas *et al*., 1983), *S. aurata, D. dentex* (Alarcón *et al*., 1998), *B. orbignyanus* (García-Carreño *et al*., 2002), *Symphysodon aequifasciata* (Chong *et al*., 2002), *S. formosus* (Natalia *et al*., 2004), *D. puntazzo* (Tramati *et al*., 2005), *S. senegalensis* (Sáenz-de Rodrgáñez *et al.,* 2005), *S. maximus* (Wang *et al*., 2006), *Latimeria chalumnae* (Tanji *et al*., 2007), *Nemipterus spp*. (Nalinanon *et al*., 2008), en *T. alalunga* y el barrilete *Katsuwonus pelamis* (Nalinanon *et al*., 2010a y b) y en *C. undecimalis* (Concha-Frias *et al*., 2016).

En otro sentido, las proteasas alcalinas de sargo presentan un pH óptimo de 9, que es común en muchas especies, con una actividad máxima entre pH 9 y 10, como se informó en pirapita (García-Carreño *et al*., 2002), Catla catla (*Labeo rohita*) y *Hypophthalmichthys molitrix* (Kumar *et al*., 2007), atún aleta azul del Pacífico (Matus-de la Parra *et al*., 2007), carpa herbívora

(*Ctenopharyngodon idella*) (Liu *et al*., 2008), juveniles de tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Jun-Sheng *et al*., 2006), *D. puntazzo* (Tramati *et al*., 2005), cíclido maya *Cichlasoma urophthalmus* (Cuenca-Soria, *et al*., 2014) y cíclido de tres puntos *C. trimaculatum* (Toledo *et al.,* 2015)) Sin embargo, existen reportes de especies que presentan más de un valor de pH óptimo, como por ejemplo en róbalo común, que muestra una actividad óptima a pH 7 y 11 (Concha-Frías *et al*., 2016), que puede atribuirse a la diversidad de enzimas e isoformas presentes en la especie (Alarcón *et al*. 1998). Aunque debe mencionarse que, el sargo presentó solo un pH óptimo, lo que indica que las proteasas digestivas intestinales presentes en la especie, muestran el mismo valor de pH óptimo, como suele ocurrir en otras especies (Matus de la Parra *et al*., 2007).

En el sargo, las proteasas ácidas son estables a pH ácido y su actividad se ve disminuida a medida que el ambiente se vuelve alcalino; mientras que las proteasas alcalinas son estables a pH alcalino, y resistentes a pHs ligeramente ácidos, estas condiciones son similares a las reportadas en cíclido maya *C. urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al*., 2014). Sin embargo, en otros peces marinos, de hábitos estrictamente carnívoros, las proteasas ácidas son estables durante un corto tiempo, a pH alcalino como se describe en atún aleta azul del Atlántico (Essed *et al*., 2002) y rodaballo (Hai-ying *et al*., 2006). Esta condición es tambien reportada para especies carnívoras de agua dulce como el pejelagarto *A. tropicus* (Guerrero-Zárate *et al.,* 2014) y especies omnívoras marinas como el lenguado de Senegal *S. senegalensis* (Sáenz *et al*., 2005).

El hecho de que, las proteasas ácidas presenten resistencia a pHs alcalinos, permite que las proteasas ácidas continúen actuando en la degradación de los alimentos cuando ingresan al intestino, hasta que los medios se alcalinizan, y es entonces que las proteasas alcalinas terminan los procesos de digestión. Sin embargo, en el sargo, se pierde actividad de proteasa ácida a pH neutro y alcalino, este proceso no se refleja, ya que la pérdida de actividad se compensa con la hidrólisis de proteasas alcalinas, que son activas en condiciones ácidas y aunado a las características del tracto digestivo del sargo, donde la presencia del ciego pilórico, un intestino grueso y esfínteres fuertes, que regulan el tránsito de los alimentos. Permiten a las proteasas alcalinas actuar desde que los alimentos ingresan al intestino, incluso a pH ácido.

Es importante señalar que, en general las proteasas alcalinas son más estables en diferentes pHs, debido a la presencia de diversas isoformas de proteasas (tripsina, quimotripsina, aminopéptidasa y carboxipéptidasas), como se puso de manifiesto en el zimograma, que reveló cuatro bandas. La presencia de cuatro isoformas aumentan la posibilidad de hidrolizar proteínas de alimentos, en un amplio rango de pH (Alarcón *et al*., 1998).

La temperatura óptima de las proteasas alcalinas de sargo fué 10 °C mayor que la temperatura óptima de las proteasas ácidas, y estas proteasas presentaron más termoestabilidad. La diferencia entre estas temperaturas óptimas se ha descrito en especies como *B. orbignyanus* (García-Carreño *et al*., 2002), *T. thynnus* (Essed *et al*., 2002) y *C. trimaculatum* (Toledo-Solís *et al*., 2015). La temperatura óptima de las proteasas ácidas se observó a 45 °C, semejante a la reportada para *S. auratus* (Alarcón *et al*., 1998) y en *T. orientalis* (Matus de la Parra *et al*., 2007), que muestra una disminución de la actividad a temperaturas desde 55 °C, un efecto relacionado con la desnaturalización de la pepsina (Nalinanon *et al*., 2008).

Por el contrario, las proteasas alcalinas exhiben actividad óptima a una temperatura de 55 °C, que es similar a lo reportado en *S. aurata* y *D. dentex* (Alarcón *et al*., 1998), en pez moteado *Pseudupeneus maculatus* (Souza *et al*., 2007), pez loro *Sparisoma* sp., en traira *Hoplias malabaricus* (Alencar *et al*., 2003) y en *O. niloticus* (Bezerra *et al*., 2005), que muestran una temperatura óptima para proteasas alcalinas entre 50 y 55 °C.

Sin embargo, debe mencionarse que, los valores óptimos de temperatura y la estabilidad térmica de las actividades de proteasa son solo parámetros operacionales enzimáticos, más que de importancia fisiológica; que puede asociarse con la configuración de las enzimas, con el hábitat, el medio ambiente y la genética de la especie (Gildberg, 1998; Nalinanon *et al*., 2008).

La identificación de las proteasas que realizan la digestión ácida en sargo se evaluó con el uso del inhibidor Pepstatin A, que mostró una inhibición del 79 %, valor similar a lo reportado en *C. urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al*., 2014) en *C. trimaculatum* (Toledo-Solís *et al.,* 2015) ambos peces dulceacuícolas, omnívoros con tendencia carnívora. Sin embargo esta inhibición (79 %), es menor que el porcentaje de inhibición reportado en especies exclusivamente carnívoras como *S. maximus* (Hai-ying *et al*., 2006), pez mandarín *Siniperca chuatsi* (Zhou *et al*., 2008), barrilete

Katsuwonus pelamis (Nalinanon *et al*., 2010b) y robalo blanco *C. undecimalis* (Concha-Frias *et al*., 2016). Por lo tanto, la hidrólisis en condiciones ácidas en el sargo se realiza en primer término por la presencia de pepsina tipo A, lo que le da una alta capacidad para hidrolizar proteínas en el estómago.

La menor inhibición de la pepsina en el estómago de *A. probatocephalus* podría estar relacionada con la presencia de otros tipos de pepsina, como ocurre en otras especies de peces (Klomklao *et al*., 2007; Chiu & Pan, 2002; Peña *et al*., 2015, 2017), ya que se observó una alta actividad residual a pH 4 y mostró una inhibición del 79 % con inhibidor de Pepstatin A, aunque esto no fue mostrado con la electroforesis bajo condiciones de PAGE nativa, ya que ésta solo reveló una banda con actividad de proteasa ácida, similar a la reportada por Alvarez-González *et al*., 2010 en la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*. La banda con actividad de proteasa ácida registrada mostró el valor de Rf = 0.49, valor menor si se compara con los valores registrados en otras especies de peces, como en cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* con un Rf = 0.75 (Alvarez-González *et al*., 2010), o en pargo rosado *L. guttatus* con un Rfs de 0.71 y 0.77 (Peña *et al*., 2017) y en los espáridos como dorada *S.aurata* y dentón común *D. dentex* con Rfs de 0.81 y 0.66 respectivamente (Alarcón *et al*., 1998). Solo en pejelagarto *A. tropicus*, (Guerrero-Zárate *et al*., 2014), que es un pez carnívoro, se reporta un valor similar (0.35), al valor reportado en el sargo.

Así mismo, los inhibidores específicos para las proteasas alcalinas tuvieron un efecto variable sobre la actividad enzimática. De estos, el grupo de serina proteasas fue inhibido por PMFS (45 %), OVO (61 %) y SBT1 (70 %), estos valores altos de inhibición revelan la alta actividad de las enzimas tipo serina proteasa en el intestino del sargo. Este patrón de inhibición de la serina proteasa es similar al reportado en *T. thynnus* (Essed *et al*., 2002), *S. aequifasciata* (Chong *et al*., 2002), *C. idella* (Liu *et al*., 2008), *C. trimaculatum* (Toledo-Solís *et al*., 2015) y en *C. undecimalis* (Concha-Frias *et al*., 2016).

Por otro lado, el grupo de metaloproteasas exhibió una baja inhibición de PHEN (23%), un valor similar al reportado por Dimes & Haard (1994) en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) con EDTA (7%). Por el contrario, el TPCK inhibió la actividad de la quimotripsina en un 30 %, similar a los informes de Alarcón y colaboradores (1998) en *D. dentex* y Chakrabarti y

colaboradores (2006) en *L. rohita*, mientras que la TLCK inhibió la actividad tipo tripsina en un 75 %, lo que indica una mayor proporción de tripsina en comparación con la quimotripsina, similar a los reportes en *B. orbiginyanus* (García-Carreño *et al.,* 2002) y en *S. formosus* (Natalia *et al*., 2004).

En este sentido, el zimograma de proteasas alcalinas mostró cuatro bandas con actividad, que es menor, que el número de bandas reportadas para otras especies de peces como en *A. tropicus* con la presencia de cinco bandas (Guerrero-Zárate *et al*., 2014), *C. undecimalis* con siete isoformas (Concha-Frías *et al*., 2016), y en otros espáridos como *S. aurata* y *D. dentex*, donde se reportaron de cinco a ocho proteasas activas con actividad caseinolítica (Alarcón *et al*., 1998). Las cuatro bandas registradas en juveniles de sargo confirman la presencia predominante de las proteasas tripsina, quimotripsina y metaloproteasas, con pesos moleculares de 21.2 kDa, 27.8 kDa y 51.3 kDa, respectivamente. TLCK inhibió todas las bandas registradas para la tripsina, lo que se esperaba ya que TLCK se ha identificado como un inhibidor de la tripsina (García-Carreño, 1992), una observación previamente reportada por Lazo y colaboradores (2007), quienes indicaron un peso molecular de 23 a 68 kDa para la tripsina en la curvina roja *Sciaenops ocellatus*. Es probable que la banda con un peso molecular de 34.9 kDa se trate de quimotripsina, ya que Souza y colaboradores, (2007) reportó un valor similar en *P. maculatus*.

Los inhibidores de serina proteasas como OVO inhibieron la banda de 51.3 kDa, SBT1 inhibió las bandas de 27.8 y 21.2 kDa, pero PMSF no inhibió ninguna banda, lo que muestra una alta resistencia de las proteasas digestivas intestinales de *A. probatocephalus* a inhibidores de tripsina o quimotripsina, lo que concuerda con lo reportado por otros autores para otras especies con hábitos omnívoros (Simpson, 2000; Castillo-Yáñez *et al*., 2005, 2006, 2009; Ben *et al*., 2011). Las metaloproteasas generalmente tienen pesos moleculares entre 45 kDa y 97 kDa (Natalia *et al*., 2004), y típicamente son inhibidas por la fenantrolina y el quelador EDTA; sin embargo, en el presente estudio EDTA no inhibió ninguna banda, lo que pudiera indicar que la tripsina y la quimotripsina no requieren de iones metálicos para su activación, como lo indicó previamente Cuenca-Soria y colaboradores (2014).

En *A. probatocephalus*, la presencia de pepsina, serina proteasas como; la tripsina y la quimotripsina y las metaloproteasas como; la aminopéptidasa y la carboxipéptidasa, sugieren un mecanismo de digestión de las proteínas similar a la de otros peces, e involucra para la hidrólisis inicial la acción de las enzimas endopéptidasas, seguida de la acción de las exopéptidasas, que se limitan a degradar cadenas cortas de péptidos, liberando aminoácidos terminales como lo indican Chong y colaboradores (2002) y López-Ramírez y colaboradores (2010).

En el presente estudio la harina de cabeza de camarón, mostró los valores mas altos de GH, incluso por encima del valor de los controles, debido probablemente a que el sargo durante su etapa juvenil se alimenta mayormente de crustáceos, lo que indicaría que su batería enzimática es capaz de degradar eficientemente esta harina. Los altos valores de GH de la harina de cabeza de camarón, son similares a los reportados por Concha Frías y colaboradores, (2016) para la harina de jaiba, en *C. undecimalis*. También se observó que en la harina de gluten de maíz se obtuvieron valores adecuados de GH, esto se debe probablemente a que el sargo es un pez omnívoro, lo que le permite hidrolizar ingredientes alimenticios de origen vegetal, con un buen índice de proteína cruda, como lo es el gluten de maíz con 60 % de proteína, datos similares son reportados por Alarcón y colaboradores (2001) en *S. aurata* con el guisante verde y la semilla de lupina. El gluten de maíz presentó una adecuada digestibilidad *in vitro* (62.3 %), diferente a lo reportado por otros autores que señalan que las harinas vegetales presentan valores bajos de GH y aminoácidos totales libres.

Otros autores (Alarcón *et al*., 2002; Pérez *et al*., 2003; Oña *et al*., 2005), reportan que la harina de pasta de soya presenta adecuados valores de GH, en otras especies de peces, lo que no ocurrió en el presente estudio, ya que la harina de pasta de soya solo presentó una digestibilidad *in vitro* del 49.4 %, este valor bajo de GH, se pueden relacionar con la presencia de algunos antinutrientes en esta harina. Referente al análisis de aminoácidos totales libres en el sargo, se registró el máximo valor con la harina de cabeza de camarón, al comparar este valor con otros reportes de espáridos como *D. dentex*, e híbrido *Dentex* X *Pagrus*, Oña y colaboradores (2003) reportan el valor más elevado para la harina de pescado. La diferencia entre estos resultados, se pueden explicar probablemente por el hecho de que, juveniles de sargo se alimenta de invertebrados de caparazón duro más que de peces.

La capacidad digestiva en juveniles de sargo esta determinada por dos posibles factores, que son: la presencia de una isoforma de pepsina, y sus proteasas digestivas intestinales, caracterizadas por presentar una alta resistencia a las condiciones de pH, temperatura e inhibidores. Por lo que se hace evidente que esta especie, en base a la bateria enzimática digestiva manifestada, se considere una especie carnívora con tendencia a la omnívoria, en esta etapa del desarrollo.

CAPÍTULO 4

REQUERIMIENTOS DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN JUVENILES

4.1 Resumen

Para promover el cultivo del sargo, es necesario profundizar en los requerimiento de proteína y lípidos de la especie, para el desarrollo de alimentos balanceados que cubran sus necesidades nutricionales. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos sobre el crecimiento y eficiencia alimenticia de sargo. Se realizaron dos experimentos de forma separada, en el primer experimento se determinó el nivel de proteína dietaria a partir de cinco niveles (35 %, 40 %, 45 %, 50 % y 55 %) y en el segundo experimento, se evaluaron cuatro niveles de lípidos dietarios (5 %, 10 %, 15 % y 20 %), ambos ensayos tuvieron una duración de 100 días. Se realizaron biometrías cada 20 días registrándose la longitud total, peso y supervivencia. Se calcularon las variables de crecimiento y eficiencia alimenticia, y se realizaron análisis proximales de las dietas y los organismos. El mayor crecimiento se registro en los organismos alimentados con 55 % de proteína, aunque no se presentaron diferencias significativas con relación a los peces alimentados con las dietas con 40 %, 45 % y 50 %. Referente al requerimiento de lípidos, se registró el mayor crecimiento en los peces alimentados con las dietas con 10 % y 15 % de lípidos. En este aspecto, se puede concluir que es posible utilizar dietas con 40 % de proteína o más y 10 % de lípidos para el cultivo de juveniles de *A. probatocephalus*.

4.2 Introducción

El desarrollo de alimentos balanceados rentables, que proporcionen una alimentación equilibrada para maximizar el crecimiento y minimizar los efectos ambientales, depende de conocer las necesidades nutricionales de la especie, y satisfacer esas necesidades con formulaciones dietéticas óptimas, así como de apropiadas prácticas de alimentación (NRC, 2011). En este sentido, uno de los aspectos más importantes en la nutrición de los peces, es el conocimiento de los requerimientos específicos de proteína y lípidos. Las proteínas y lípidos son los mayores componentes de los alimentos balanceados y los más costoso (Jones *et al*., 1996; Yang *et al*.,

2002; Luo *et al*., 2004; Dong *et al*., 2014), y sus requerimientos son los niveles que dan el máximo crecimiento y mejor beneficio económico, siendo éstos los factores más importantes en una producción acuícola rentable (Li *et al*., 2012; Carter *et al*., 2012; El-Husseiny *et al*., 2013; Mongile *et al*., 2014).

El efecto en el crecimiento de diferentes niveles de proteína y lípidos en la dieta de los peces varía de una especie a otra, debido a diferentes factores, como: los hábitos de alimentación, la temperatura del agua, la etapa de desarrollo del pez, el método, frecuencia y tipos de alimentación, el sexo, la densidad, el sistema de cultivo, la calidad del agua, y las fuentes de los ingredientes empleados en los alimentos, etc. (Álvarez-Gónzalez *et al*., 2001; Arce & Luna, 2003; Alves *et al*., 2007; Mongile *et al*., 2014).

Para promover el cultivo de cualquier especie, es necesario profundizar en el conocimiento de los requerimiento de proteína y lípidos específicos, para el desarrollo de alimentos balanceados que cubran sus necesidades alimentarias. Referente a la alimentación del sargo en cautiverio, existen algunos reportes hechos por Tucker (1987), que señala que un lote de sargos alcanzó 450 g a los doce meses de cultivo, con un incremento en peso de 1.9 g día^{-1}, alimentados *ad libitum* con alimento comercial de trucha, conteniendo 45 % de proteína y 12 % de lípidos. Así mismo, Tucker (2004) reporta que alimentó juveniles y adultos de sargo con pescado crudo e hígado de pollo cocido, espinacas congeladas, algas frescas y una mezcla de alimentos comerciales para trucha y salmón, obteniendo pesos promedios de 550 g en un año de cultivo. En el mismo sentido, Merino-Contreras y colaboradores (2018), reportan que un lote de sargos alimentados *ad libitum* con alimento balanceado semihúmedo con 45 % de proteína y 10 % de lípidos, presentó un incremento en longitud patrón promedio (0.064 ±0.02 cm día^{-1}) y peso promedio (1.97 ±0.4 g día^{-}). Sin embargo, los requerimientos en proteínas y lípidos de juveniles de sargo se desconocen, por lo que, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos en dietas experimentales, sobre el crecimiento y eficiencia alimenticia de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*), lo que sentará las bases para la elaboración de dietas prácticas que permitan su adecuado crecimiento en cultivo.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Evaluación de dietas con diferentes niveles de proteína

Se emplearon 300 crías de sargos silvestres con un peso promedio 0.28 ±0.04 g, los cuales fueron capturados en el Sistema Lagunar de Alvarado, en la localidad de Punta Grande (18°47'47.41¨N, 95°49.5'19" O), Alvarado, Veracruz, México. Las crías fueron aclimatadas al cautiverio por 15 días (el tiempo en que todos los organismos aceptaron comer el alimento balanceado para tilapia), alimentadas a saciedad con una dieta con 45 % de proteínas, antes del inicio del experimento.

Con el programa MIXIT V.5.0, se formularon cinco dietas experimentales semipurificadas, isocalóricas con el mismo porcentaje de lípidos, para evaluar el efecto de diferentes niveles de proteínas en la dieta. Se utilizó un diseño experimental con 5 tratamientos por triplicado, que conformaron las dietas con diferentes niveles de proteína: 35 %, 40 %, 45 %, 50 % y 55 %. Los ingredientes utilizados en su elaboración fueron los propuestos por Civera & Guillaume (1989), su composición proximal se resume en la tabla 1. Las unidades experimentales fueron tanques rectangulares de fibra de vidrio de 80 L de capacidad, con un sistema de recirculación, con filtro biológico y aireación, donde se colocaron 20 organismos por tanque, fueron alimentados con el 10 % de su biomasa con las diferentes dietas por 100 días, dividida en cuatro raciones, suministradas a las 8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 h. Se realizaron biometrías de todos los organismos cada 20 días, se anestesió a los organismos con aceite esencial de clavo 250 ppm. Se registró el peso húmedo en g con una báscula digital (Ohaus® HH 120, precisión 120 g ± 0.1 g, Shenzhen, China) y la longitud total en mm por medio de un vernier digital (EXEL CR2032, precisión 0.1 mm, China), así como la supervivencia en porcentaje [(número final de peces/número inicial de peces)*100]. La calidad del agua del sistema fue determinada diariamente con una sonda multiparamétrica (Hanna HI 9828, Woonsocket, Rumania). Los promedios registrados a lo largo del ensayo fueron: salinidad 10 ±1 psu, temperatura de 26.5 ±3°C, oxígeno disuelto 5.8 ±1.3 mg L^{-1} y amonio total 0.2 ±0.1mgL^{-1}.

Tabla 1 Ingredientes y composición proximal de dietas empleadas para determinar el efecto de diferentes niveles de proteína en crías de sargo *A. probatocephalus*.

	Dietas (% proteínas)				
Ingredientes g (100 g dieta)$^{-1}$	**55**	**50**	**45**	**40**	**35**
Caseína[a]	55.63	49.09	42.58	38.07	29.59
Harina integral de sorgo[c]	10.12	16.81	23.48	30.13	38.77
Harina de sardina[b]	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Aceite de pescado[b]	12.64	12.49	12.34	12.19	12.04
Lecitina de soya[b]	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Alginato de sodio[b]	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
L-Lisina[e]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
L-Metionina[e]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla de vitaminas[d]	2	2	2	2	2
Premezcla de minerales[d]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Acido ascórbico[e]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Betaína[e]	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Composición proximal (% de materia seca, excepto humedad, ±SD)					
Proteína cruda	53.0 ±1.9	50.5 ±1.0	43.3 ±1.6	38 ±0.9	32.2±0.9
Extracto etéreo	17.8 ±0.8	16.5 ±0.6	18.7±0.1	20.5±0.0	18.1±0.2
Ceniza	10.2±0.6	10.3 ±0.4	9.3±0.6	6.6±0.3	6.7±0.0
Fibra	1.1 ±0.1	1.3 ±0.3	1.5 ±0.1	1.5 ±0.1	1.04 ±0.0
NFE[f]	17.9	21.4	27.2	33.4	41.9
Energía bruta (cal g^{-1})	6053 ±458	6248 ±82	6231 ±241	6071 ±432	6119 ±348
Humedad	7.9 ±0.1	8.6 ±0.1	6.9 ±0.1	8.1 ±0.1	7.4 ±0.1

a Hammar quality Casein, Research Organic No. catálogo 1082C
b Proteínas marinas y Agropecuarias S.A.C.V. Guadalajara, Jalisco, México
c Galmex Comercializadora de insumos agrícolas S.A.C.V, Villahermosa, Tabasco
d Rovimix L-EC Roche
e Sigma-Aldrich
f Extracto Libre de Nitrógeno calculado como 100- (% proteína+% de extracto etéreo+% Cenizas+% Fibra).

Para la preparación de las dietas, los ingredientes secos se pulverizaron y tamizaron a través de una malla de 0.5 mm, se adicionó el aceite de pescado y la lecitina de soya, y se agregó 40% en peso de agua destilada. Todos los ingredientes fueron mezclados en una batidora Kitchen Aid (KS55, Hawaii, EUA) durante 10 min. La manufactura de los pellets se realizó al pasar la masa homogénea en un molino para carne (Toro Rey M-22 RI, DF. México), y posteriormente se

secaron en un horno (Coriat HG 25A, DF. México) a 50 °C durante 24 h, en seguida fueron tamizados manualmente en diferentes tamaños. Las dietas fueron almacenadas en un congelador (Environmetal equipment 10310, Cincinnati, Ohio, USA) a -21 °C hasta su uso.

Se tomaron muestras de las dietas y de los peces de cada ensayo al inicio y al final del experimento, las cuales fueron almacenadas en un congelador (Environmetal equipment 10310, Cincinnati, Ohio, USA) a -21 °C, para posteriormente analizar por triplicado su composición proximal, se determinó el porcentaje de materia seca, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas y extracto libre de nitrógeno con los métodos de la AOAC (2000), la proteína cruda y la energía bruta se determinaron con un Analizador elemental Flash 2000 de CHNS/O (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom).

4.3.2 Evaluación de dietas con diferentes niveles de lípidos

Se emplearon 144 juveniles de sargo silvestres, con peso promedio de 62.3 ±3.3 g, los cuales fueron capturados del sistema Lagunar de Alvarado, en la localidad de La laguna (18° 47' 47¨N, 95° 49' 19" O) Alvarado, Veracruz, México, aclimatados al cautiverio de la misma forma que en el apartado anterior.

Con el programa MIXIT V.5.0, se formularon cuatro dietas experimentales isocalóricas para evaluar el efecto de diferentes niveles de lípidos en la dieta. Se utilizó un diseño experimental con 4 tratamientos por triplicado, que conformaron las dietas con diferentes niveles de lípidos: 5 %, 10 %, 15 % y 20 %, con el mismo porcentaje de proteína. Los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas fueron propuestos por Huerta (2008), su composición proximal se resume en la tabla 2. Las unidades experimentales fueron tanques circulares de fibra de vidrio de 800 L de capacidad, con un sistema de recirculación, con filtro biológico y aireación, donde se colocaron 12 organismos por tanque, los peces fueron alimentados con las dietas por 100 días, dos veces al día (9:00 y 14:00 h), a saciedad aparente por 15 min, determinándose la cantidad consumida diariamente.

Del total de los organismos se realizaron biometrías cada 20 días, los peces fueron anestesiados de la misma forma que en el apartado anterior, se registraron el peso húmedo en g, con una báscula digital (Ohaus® HH 120, precisión 120 g ± 0.1 g, Shenzhen, China), la longitud total en mm por medio de un vernier digital (EXEL CR2032, precisión 0.1 mm, China), así como la supervivencia. La calidad del agua del sistema fue determinada diariamente con una sonda multiparamétrica (Hanna HI 9828, Woonsocket, Rumania), los promedios registrados a lo largo del ensayo fueron: salinidad 10±2 psu, temperatura de 26.5 ±1°C, oxígeno disuelto 5 ±1.8 mg L^{-1} y amonio total 0.2 ±0.1mg L^{-1}.

Tabla 2. Ingredientes y composición proximal de dietas empleadas para determinar el efecto de diferentes niveles de lípidos en juveniles de sargo *A. probatocephalus*.

	Dietas (% de lípidos)			
Ingredientes g (100 g dieta)$^{-1}$	5	10	15	20
Caseína[a]	44.57	45.13	45.69	46.29
Harina integral de sorgo[c]	37	31.15	25.30	19.36
Harina de sardina[b]	10.0	10.0	10.0	10.0
Aceite de pescado[b]	2.02	5.81	9.6	12.95
Lecitina de soya[b]	1	2.5	4.0	6.0
Alginato de sodio[b]	3.0	3.0	3.0	3.0
L-Lisina[e]	0.5	0.5	0.5	0.5
L-Metionina[e]	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla de vitaminas[d]	2	2	2	2
Premezcla de minerales[d]	1.5	1.5	1.5	1.5
Acido ascórbico[e]	0.05	0.05	0.05	0.05
Betaína[e]	0.04	0.04	0.04	0.04
Composición proximal (% de materia seca, excepto humedad, ±SD)				
Proteína cruda	50.9 ±1	51.8 ±0.5	50 ±1.4	50.8 ±1.5
Extracto etéreo	5.8 ±0	9.32 ±0.5	14.5 ±0.3	19.5 ±0.3
Ceniza	10 ±0	10 ±0	9.4 ±0	10 ±0.2
Fibra	0.38 ±0.1	0.44 ±0.1	0.63 ±0.1	0.45 ±0.1
NFE[f]	32.9	28.4	25.5	19.2
Energía bruta (cal g^{-1})	5968 ±190	5890 ±190	6232 ±44	6208 ±30
Humedad	9.9 ±0.1	9.4 ±0.1	10.5 ±0.3	4.1 ±0.1

[a] Hammar quality Casein, Research Organic No. catálogo 1082C
[b] Proteínas marinas y Agropecuarias S.A.C.V. Guadalajara, Jalisco, México
[c] Galmex Comercializadora de insumos agrícolas S.A.C.V, Villahermosa, Tabasco

[d] Rovimix L-EC Roche
[e] Sigma-Aldrich
[f] Extracto Libre de Nitrógeno calculado como 100- (% proteína+ % de extracto etéreo+ % Cenizas+ % Fibra).

Las dietas fueron elaboradas de la misma forma descrita con anterioridad. Finalmente, se verificó la composición proximal de las dietas, así como de los organismos al inicio y final del experimento, como se señala en el apartado anterior.

4.3.3 Variables de crecimiento y eficiencia alimenticia

A partir de los datos biométricos registrados de los peces de ambos ensayos, se determinaron las siguientes variables de crecimiento: tasa específica de crecimiento (SGR), peso diario ganado (ADG), peso ganado (WG) y factor de condición (FC), de acuerdo a Wang *et al*., (2005) y Amirkolaine *et al.,* (2005), con las siguientes fórmulas:

Tasa específica de crecimiento (SGR) = [(ln peso final – ln peso inicial)/días] *100.

Peso diario ganado (ADG) g día^{-1} = (promedio del peso final – promedio del peso inicial) /número de días

Factor de condición (FC)= (peso promedio final –longitud promedio del cuerpo final $^{3)}$ *100.

Peso ganado (WG %) g = [(Peso promedio final – Peso promedio inicial /Peso promedio final] *100.

A partir de los datos biométricos registrados y las determinaciones de los análisis proximales de los peces, se determinaron también los siguientes parámetros de eficiencia alimenticia: ingesta diaria de alimento (DFI), factor de conversión alimenticia (FCR), tasa de eficiencia proteica (PER), valor de proteína productiva (PPV), energía bruta retenida (GER), energía diaria ganada (DEG), tasa de proteína diaria ganada (DPG) y tasa absoluta de alimentación de lípidos (ALFR), de acuerdo a Wang *et al*., (2005), Almirkolaie *et al*., (2005), con las siguientes fórmulas:

Ingesta diaria de alimento (DFI) g = (alimento consumido g de material seca)/ número de peces/ día.

Factor de conversión alimenticia (FCR)= (alimento consumido g de material seca / (peso ganado en los peces en g).

Tasa de eficiencia proteíca (PER) g = (Peso húmedo ganado en los peces g/ (consumo de proteína g).

Valor de proteína productiva (PPV) = (% de proteína final del cuerpo x peso del cuerpo final) –(% inicial de la proteína del cuerpo x peso del cuerpo inicial / (total del consumo de proteína (g) x peso ganado (g) x100).

Energía bruta retenida (GER) kJ = (Energía ganada en los peces, kJ) /consumo de energía, kJ) x 100.

Energía diaria ganada (DEG) kJ = (consumo de energía, g)/ tiempo (días) x N (número final de peces).

Tasa de proteína diaria (DPG)= (consumo de proteína, g)/ tiempo (días) x N (número final de peces).

Tasa absoluta de alimentación= Cantidad de alimento consumido/100

Tasa absoluta de alimentación de lípidos (ALFR)= Tasa absoluta de alimentación x % lípidos/100.

4.3.4 Análisis estadístico

De cada experimento se verificó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Chakravarti et al., 1967) y la homocedasticidad con la prueba de Levene (Hotelling, 1988). Los datos de peso húmedo y longitud total de los peces, se analizaron con ANOVA de una vía, con el nivel de proteína y de lípidos como factores, y para detectar las diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba a posteriori de Tukey. Los datos de las variables de crecimiento, índices de calidad alimentaria y composición proximal de los peces, que no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica, fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba a posteriori de Nemenyi. Las diferencias se consideraron significativas a $P< 0.05$, en todas las pruebas se utilizó el programa Statistica (v 7.1, Stat Soft, Tulsa, Ok, USA).

4.4 Resultados

4.4.1 Efecto de dietas con diferentes niveles de proteína

Se obtuvo el mayor crecimiento en peso húmedo en los organismos alimentados con la dieta con 55 % de proteína, detectándose diferencias significativas a los días 80 (F=1 4, 0.05=11.2, p=0.0001) y 100 (F1 4, 0.05=17.2, p=0.0001) de tratamiento, entre los peces alimentados con las dietas de 35 % y el resto de las dietas. Con respecto a la longitud total se obtuvo el mayor crecimiento de los peces alimentados con las dietas de 45 % y 50 % de proteína, registrándose diferencias significativas entre los organismos alimentados con 35 % de proteínas y el resto de las dietas, a los días 80 (F1 4, 0.05=7.8, p=0.0039) y 100 (F1 4, 0.05=7.8, p=0.0000) de tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3 Peso (g) y longitud total (mm) de crías de sargo (*A. probatocephalus*) alimentados por 100 días con dietas con diferentes niveles de proteína (promedio ±SD).

	Niveles de proteína (%)				
Muestreo (días)	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**
Peso (g)					
0	0.35 ±0.1	0.29 ±0.3	0.28 ±0.3	0.31 ±0.3	0.28 ±0.3
20	0.61 ±0.1	0.63 ±0.2	0.65 ±0.3	0.66 ±0.3	0.65 ±0.3
40	0.93±0.2	0.93 ±0.1	1.24 ±0.1	1.2 ±0.2	1.23 ±0.2
60	1.41 ±0.3	1.43 ±0.3	1.8 ±0.2	1.75 ±0.2	1.76 ±0.3
80	1.85 ±0.3^{a}	2.56 ±0.2^{b}	3 ±0.1^{b}	3 ±0.2^{b}	3 ±0.2^{b}
100	2.76 ±0.1^{a}	3.94 ±0.4^{b}	4.28 ±0.2^{b}	4.38 ±0.1^{b}	4.51 ±0.2^{b}
Longitud total (mm)					
0	21.1 ±1	21.7 ±1	22.8 ±0.5	23.8 ±1	22.5 ±1
20	31.9 ±1	32.4 ±1	33 ±0.8	30 ±1.5	29 ±2
40	37.3 ±1	38.1 ±1	41 ±2	38 ±2	37.4 ±2
60	40.5 ±1	42 ±2.5	44.5 ±1	42.5 ±2	44 ±2
80	44.7 ±2^{b}	49 ±3^{a}	52.9 ±1^{a}	52.5 ±2^{a}	51.9 ±1^{a}
100	49.2 ±1^{b}	60.7 ±2^{a}	61 ±1^{a}	61.1 ±2^{a}	60 ±2^{a}

Valores promedios en la misma fila con superíndices diferentes presentan diferencia significativa (P< 0.05), Tukey.

Dentro de las variables de crecimiento: SGR, ADG, y WG se registraron los valores más alto en los organismos alimentados con 55 % de proteínas, se presentaron diferencias significativas (SGR: F1 4, 0.05= 6.4, p= 0.0081, ADG: F1 4, 0.05= 17.9, p= 0.0001, WG: F 1 4, 0.05= 18, p= 0.0001), con los peces alimentados con la dieta con 35 % de proteínas. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas ($P< 0.05$) entre los valores registrados de FC. Las dietas no afectaron la supervivencia de los peces, ya que se registraron valores similares y no hubo diferencia significativa entre ellas. En el análisis de las tasas de eficiencia alimenticia: DFI, FCR, PER, PPV, GER y DEG, no se observaron diferencias significativas entre los organismos alimentados con las diferentes dietas. En la tasa de DPG se registraron los valores mayor en los organismos alimentados con la dieta con 55 % de proteína, con diferencias significativas (F1 4, 0.05= 6.7, p=0.0069) con los peces alimentados con las dietas 35 % , 40 % y 45 % de proteína y los peces alimentados con las dietas con 50 % y 55 % de proteína (Tabla 4).

En el porcentaje de proteína cruda se registraron los valores más altos con las dietas 40 % y 45 % de proteína, con diferencias significativas (F1 5, 0.05=18, p= 0.0000) entre los organismos alimentados con la dieta con 35 % de proteínas, el resto de las dietas y los peces al inicio del experimento. En los otros análisis proximales no se presentaron diferencias significativas entre las dietas; sin embargo, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de extracto etéreo (F1 5, 0.05=5.8, p= 0.0060) y cenizas (F1 5, 0.05=6.2, p= 0.0046), entre los organismos analizados al inicio del experimento y los alimentados con las diferentes dietas experimentales (Tabla 5).

Tabla 4 Variables de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia de crías de sargo (*A. probatocephalus*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de proteína (promedio ±SD).

	Niveles de proteína (%)				
	35	**40**	**45**	**50**	**55**
SGR (% día^{-1})[1]	1.02 ±0.18^{b}	1.36 ±0.08^{a}	1.46 ±0.14^{a}	1.32 ±0.16^{a}	1.52 ±0.05^{a}
ADG (g día^{-1})[2]	0.02 ±0.00^{b}	0.04 ±0.00^{a}	0.04 ±0.00^{a}	0.04 ±0.00^{a}	0.04 ±0.00^{a}
FC[3]	1.81 ± 0.36	1.76 ± 0.24	1.88 ± 0.29	1.88 ± 0.33	2.13 ± 0.39

WG (%)[4]	176 ± 32[b]	293 ± 32[a]	325 ± 18.9[a]	343± 37.8[a]	351± 25.1[a]
Supervivencia (%)[5]	73 ±1	70 ±1	70 ±1	70 ±2	73 ±1
DFI[6]	0.04 ±0.01	0.04 ±0.00	0.04 ±0.01	0.04 ±0.00	0.04 ±0.00
FCR[7]	2.13± 0.28	1.73±0.18	2.36±0.26	2.21±0.22	1.81±0.24
PER[8]	1± 0.25	1.28 ±0.16	0.94 ±0.28	0.75 ±0.07	0.91 ±0.11
PPV[9]	52 ±9	50 ±5	50 ±8	48 ±8	43.4 ±7
GER (%)[10]	19.2 ±2.5	18.4 ±2	18.9 ±2	17.3 ±4	22 ±1
DEG (kJ fish^{-1})[11]	13 ±2	12.6 ±3	12.6 ±2	12.9 ±2	13 ±1.5
DPG (mg fish^{-1})[12]	15.8 ±2.5[b]	17.5 ±1.1[b]	21.3 ±2.8[b]	22.9 ±2.9[a]	24.6 ±2.6[a]

Valores promedios en la misma fila con superíndices diferentes presentan diferencia significativa ($P< 0.05$).

[1]Tasa específica de crecimiento (SGR), [2]Peso diario ganado (ADG), [3]Factor de condición (FC), [4]Peso ganado (WG %), [5]Supervivencia (%), [6]Ingesta diaria de alimento (DFI), [7]Factor de conversion alimenticia (FCR), [8]Tasa de eficiencia proteíca (PER), [9]Valor de proteína productiva(PPV), [10]Energía bruta retenida (GER), [11]Energía diaria ganada (DEG), [12]Tasa de proteína diaria ganada (DPG).

Tabla 5. Composición bioquímica (% de materia seca, excepto humedad) de todo el cuerpo de juveniles de sargo alimentados con dietas con diferentes niveles de proteína (promedio ±SD).

	Niveles de proteína (%)					
Análisis (%)	**Peces inicio**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**
Proteína cruda	55.3 ±0.3[a]	54.3 ±0.8[a]	64.3 ±1.7[b]	64.5 ±1.5[b]	62.1 ±2.6[b]	62.9 ±2.3[b]
Extracto etéreo	24 ±2.6[b]	18.8 ±1.2[a]	20.8 ±0.8[a]	20.7 ±0.9[a]	18.8 ±1.5[a]	19 ±0.9[a]
Ceniza	10.9 ±0.4[b]	12.6 ±1.3[a]	12.9 ±0.8[a]	13.4 ±0.5[a]	13.5 ±0.5[a]	13.9 ±0.5[a]
Energía bruta (cal g^{-1})	6138 ±214	6190 ±29	6179 ±174	5975 ±203	5985 ±210	6184 ±30
Humedad	73.5 ±0.6	74 ±0.5	74.8 ±0.4	75 ±0.4	74.9 ±0.3	74.3 ±0.5
NFE[1]	9.8	14.3	2	1.4	5.6	4.2

Valores promedios en la misma fila con superíndices diferentes presentan diferencia significativa ($P< 0.05$), Tukey.
[1]Extracto Libre de Nitrógeno calculado como 100-(% proteína+ % de extracto etéreo+ % Cenizas).

4.4.2 Efecto de dietas con diferentes niveles de lípidos

En los organismos alimentados con dietas con diferentes niveles de lípidos se observó el mayor crecimiento en peso húmedo con la dieta 10 % de lípidos. Se registró diferencia significativa a los días 80 (F1 3, 0.05=21, p=0.0003) y 100 (F1 3, 0.05=16.2, p=0.00009) de tratamiento, entre los peces alimentados con las dietas con 10 % y 15 % de lípidos y los peces alimentados con las dietas con 5 % y 20 % de lípidos. Respecto a la longitud total de los organismos, se registró el mayor valor en los organismos alimentados con la dieta con 15 % de lípidos, a partir del día 80 de tratamiento, de igual manera, no hubo diferencia significativa ($P< 0.05$), con los peces alimentados con la dieta con 10 % de lípidos, se registró diferencia significativa a los días 80 (F1 3, 0.05=30, p=0.0026) y 100 (F1 3, 0.05=36.9, p=0.0004) de tratamiento, entre los peces alimentados con estas dos dietas (10 % y 15 % de lípidos) y los peces alimentados con las dietas 5 % y 20 % de lípidos. (Tabla 6).

Tabla 6 Peso húmedo (g) y longitud total (cm) promedio de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*), alimentados 100 días con dietas con diferentes niveles de lípidos (promedio ±SD).

	Niveles de lípidos (%)			
Muestreo (días)	**5**	**10**	**15**	**20**
Peso (g)				
0	64.1 ±1	64.2 ±2.1	62.6 ±4	64.1 ±3.4
20	76.4 ±2	79.6 ±2.6	75.7 ±3.5	77 ±2.4
40	85 ±2.2	88.5 ±3.4	90.2 ±3.2	90 ±3.4
60	97.5 ±3.2	97.3 ±1.7	104.5 ±4	97.7 ±3
80	103.1 ±2[a]	114.3 ±2[b]	117.2 ±2.3[b]	103.7 ±4[a]
100	111.7 ±3[a]	127.3 ±2.1[b]	126.6 ±2[b]	108.2 ±4[a]
Longitud total (cm)				
0	13.4 ±0.2	13.2 ±0.9	13.6 ±0.6	13.4 ±0.7
20	14.7 ±0.2	14.9 ±0.6	14.8 ±0.3	14.9 ±0.7
40	15.1 ±0.2	15.6 ±0.3	15.7 ±0.6	15.3 ±0.8
60	16.6 ±0.3	16.6 ±0.3	16.2 ±0.8	16.3 ±0.8
80	16.9 ±0.2[a]	18.1 ±0.5[b]	18.3 ±0.3[b]	17 ±0.4[a]
100	17.3 ±0.7[a]	19 ±0.5[b]	19.2 ±0.3[b]	17 ±0.6[a]

Valores promedios en la misma fila con superíndices diferentes presentan diferencia significativa ($P< 0.05$), Tukey.

No se observó diferencia significativa en los valores de la SGR y FC, ya que se obtuvieron en ambos variables valores semejantes. Para el ADG y WG se registraron los valores más altos en los organismos alimentados con las dietas 10 % y 15 % de lípidos, con diferencias significativas (ADG: F1 4, 0.05 =266.7, p = 0.0000; WG: F1 4, 0.05=18.7, p = 0.0005) entre estas dos dietas y las dietas 5 % y 20 % de lípidos. Las dietas no afectaron la supervivencia de los organismos, ya que no se registraron diferencias significativas (Tabla 7). Respecto a las tasas de eficiencia alimenticia, se observó que en la DFI, FCR y DEG no se observaron diferencias significativas. En la tasa de GER, el valor mayor se registró en los organismos alimentados con la dieta 15 % de lípidos, con diferencias significativas (F1 4, 0.05=8.5, p=0.0072) entre la dieta 5 % de lípidos y el resto de las dietas. Por otra parte, en la tasa de ALFR se observó el valor mayor con la dieta 20 % de lípidos, se registraron diferencias significativas (H0.05=10.4, 3, p=0.0156) con el resto de las dietas (Tabla 7). Para el extracto etéreo, el valor más alto se registró con la dieta 20 % de lípidos, con diferencias significativas (F1 5, 0.05=21, p=0.0000), entre los organismos alimentados con las diferentes dietas, siendo similares los valores de las dietas 10 % y 15 %, y de los peces al inicio del experimento. En el resto de análisis proximales no se presentaron diferencias significativas (Tabla 8).

Tabla 7 Variables de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia de juveniles de sargo (*A. probatocephalus*) alimentados con dietas con diferentes niveles de lípidos (promedio ±SD).

	Niveles de lípidos (%)			
	5	**10**	**15**	**20**
SGR (% día^{-1})[1]	4.6 ±0.3	4.7 ±0.4	4.8 ±0.2	4.6 ±0.4
ADG (g día^{-1})[2]	0.44 ±0.1^{a}	0.64 ±0.0^{b}	0.64 ±0.0^{b}	0.41 ±0.0^{a}
FC[3]	2.1 ± 0.1	2 ± 0.3	2 ±0.4	2.2 ±0.2
WG (%)[4]	109 ± 3.1^{a}	122.3 ± 5.1^{b}	122.8 ±2.9^{b}	106.2 ±4.8^{a}
Supervivencia (%)[5]	83.3 ±8.3	91.6 ±8.3	91.6 ±8.3	91.6 ±8.3
DFI[6]	1.02 ±0.0	0.94 ±0.0	0.98 ±0.0	1.0 ±0.0
FCR[7]	1.1 ±0.2	0.94 ±0.1	0.84 ±0.3	1 ±0.1
GER (%)[8]	17.2 ±3^{a}	24 ±1^{b}	25 ±2^{b}	22.4 ±2^{b}
DEG (kJ fish^{-1})[9]	12 ±1.5	12.9 ±2	12.6 ±2	12.8 ±3

ALFR[10]	0.006 ±0.0[a]	0.011 ±0.0[b]	0.017 ±0.0[b]	0.025 ±0.0[c]

Valores promedios en la misma fila con superíndices diferentes presentan diferencia significativa ($P< 0.05$).
[1]Tasa específica de crecimiento (SGR), [2]Peso diario ganado (ADG), [3]Factor de condición (FC), [4]Peso ganado (WG %), [5]Supervivencia (%), [6]Ingesta diaria de alimento (DFI), [7]Factor de conversion alimenticia (FCR), [8]Energía bruta retenida (GER), [9]Energía diaria ganada (DEG), [10] Tasa absoluta de alimentación de lípidos (ALFR).

Tabla 8. Composición bioquímica (% de materia seca, excepto humedad) de todo el cuerpo de juveniles de sargo alimentados con dietas con diferentes niveles de lípidos (promedio ±SD).

		Niveles de lípidos (%)			
Análisis (%)	**Peces inicio**	**5**	**10**	**15**	**20**
Proteína cruda	55.3 ±0.3	54.3 ±0.8	55.3 ±1.7	55.5 ±1.5	53.5 ±2.6
Extracto etéreo	24 ±2.6[b]	18.8 ±1.2[a]	23 ±0.8[b]	23.7 ±0.9[b]	29 ±1.5[b]
Ceniza	11.9 ±0.4	11.6 ±1.3	12.9 ±0.8	11.9 ±0.5	12.5 ±0.5
Energía bruta (cal g^{-1})	6138 ±214	6190 ±29	6179 ±174	6200 ±203	6215 ±210
Humedad	73.5 ±0.6	74 ±0.5	74.8 ±0.4	73 ±1	74.5 ±0.3
NFE[1]	9.6	15.3	8.7	8.9	5.2

Valores promedios en la misma fila con superíndices diferentes presentan diferencia significativa ($P< 0.05$) Tukey. [1]Extracto Libre de Nitrógeno calculado como 100-(% proteína+ % de extracto etéreo+ % Cenizas).

4.5 Discusión

En este estudio, se encontró que el nivel aproximado de proteína dietética, que mostró un crecimiento máximo en peso húmedo en crías de sargo, fue la dieta con 55 % de proteína, aunque no se observaron diferencias significativas ($P< 0.05$) con las dietas con 40 %, 45 %, y 50 % de proteína, solo con la dieta con 35 % de proteína, lo que implica que esta especie presenta un adecuado crecimiento con dietas con 40 % o más de proteína, este nivel de proteína es similar al reportado para peces carnívoros tales como la curvina roja *Sciaenops ocellatus* (Mc Googan & Gatlin, 1998), la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-Gónzalez *et al*., 2001), pargo amarillo *Lutjanus argentivensis* (Maldonado-García *et al*., 2012) y los espáridos como la dorada *S. aurata* (Sabaut & Luquet, 1973; Lupastsch *et al*., 2003), el dentón común *Dentex*

dentex (Espinos *et al*., 2003), la brema manchada *Pagellus bogaraveo* (Silva *et al*., 2006), en el besugo *Diplodus puntazzo* (Atienza *et al*., 2004; Coutinho *et al*., 2012), y en el porgy rojo *Pagrus pagrus* (Schuchardt *et al.,* 2008).

Cabe señalar que este requerimiento de proteína es más alto de lo que se esperaría para peces omnívoros como el mismo sargo, la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Siddiqui *et al*., 1998), o el bagre *Ictalurus punctatus* (Robinson & Robinette, 2010) y los espárido besugo blanco *Diplodus sargus* (Sá *et al*., 2008) y el besugo bandeado *D. vulgaris* (Ozório *et al*., 2009; Bulut *et al*., 2014). El presente estudio se realizó con crías con una talla promedio final de alrededor de 60 mm, lo que explica el requerimiento alto de proteínas registrado, ya que las crías de sargo de 50 mm de longitud se reportan de hábitos carnívoros (Jennings, 1985), por lo que sus requerimientos de proteína son altos, mientras que los adultos se consideran omnívoros, ya que se alimentan principalmente de algas e invertebrados (Ogburn, 1984; Castillo-Rivera *et al*., 2007).

Se observó un adecuado crecimiento de juveniles de sargo con las dietas que contenían 40 % o más de proteína, dado que la proteína constituye en el cultivo de peces el elemento más caro, es recomendable incorporar el nivel de proteína mínimo necesario para cubrir la demanda de mantenimiento y crecimiento, y no alterar la calidad del agua (Li *et al*., 2012). Cualquier exceso se considera inútil, tanto biológica como económicamente ya que es importante minimizar la cantidad de proteína utilizada para la energía (De Silva & Anderson, 1995; NRC, 2011; Deng *et al*., 2011; Ahmed & Maqbool, 2017). Por lo que, puede considerarse para la especie un nivel del 40 % de proteína como adecuado, esperando que sus requerimientos sean menores a medida que el organismo crece, ya que la especie se considera omnívora.

En algunos casos, cuando se excede el requerimiento de proteína, la tasa de crecimiento se mantiene constante o disminuye, debido a que la proteína dietética se usa para metabolizar el exceso de aminoácidos absorbido o bien se presenta la acumulación de lípidos en los tejidos (Jobling, 2012), esto no ocurrió en el sargo, ya que generalmente el valor de la tasa específica de crecimiento (SGR) se incremento conforme las dietas contenían mayor nivel de proteínas, registrándose el valor mayor (1.52) con la dieta con 55 % de proteína, estos valores fueron similares a lo reportado para la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al*.,

2001), besugo bandeado *D. vulgaris* (Bulut *et al*., 2014) y en la dorada de aleta negra *Acanthopagrus serda* (Rahim *et al*., 2017).

Los valores de ADG y PER registrados en el presente estudio son bajos en comparación con lo obtenido por otros autores en otras especies como la dorada *S. aurata* (Robaina *et al.,* 1997), lubina Europea *Dicentrarchus labrax* (Ballestrazzi *et al*., 1994) y en la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2001) y en el besugo bandeado *D. vulgaris* (Bulut *et al*., 2014), la diferencia en estos resultados podría deberse a la composición de aminoácidos de las dietas semipurificadas, ya que se sabe que la caseína está limitada en arginina para muchas especies estudiadas (Chen & Tsay, 1994), que pudiera ser el caso del sargo, por lo que se recomienda utilizar otras fuentes de proteína para futuras investigaciones. Los valores PPV registrados indican que la asimilación de proteínas fueron relativamente altos en todos los tratamientos (43-50), así mismo, se registró que la eficiencia de la proteína disminuyó al aumentar el nivel de proteína en la dieta, similar a lo reportado para la carpa común *Cyprinus carpio* (Cho *et al*., 2001) y en besugo blanco *D. sargus* (Ozório *et al*., 2006; Shymaa *et al*., 2011). En este aspecto, se debe prestar especial atención al índice de conversión de alimento (FCR), que, en nuestro estudio, registro el mejor valor (1.73 ± 0.18) para los peces alimentados con la dieta con 40 % de proteína, aunque fueron estadísticamente iguales a los peces alimentados con los tratamientos con mayores niveles de proteína.

Es así que, nuestros valores de FCR fueron similares a los reportados por diversos autores en otras especies de peces marinos (Teng *et al*., 1978; Serrano *et al*., 1992; Álvarez-Gonzáles *et al*., 2001; Maldonado-García *et al*., 2012; Bulut *et al*., 2014). Estos resultados, indican que las dietas con 40 % o más de proteína, fueron adecuadas para satisfacer las necesidades de proteínas de las crías de sargo.

Finalmente, referente a la composición proximal de los peces, se observó diferencias significativas en el porcentaje de proteína cruda y extracto etéreo de los peces alimentados con la dieta de 35 % de proteína, en comparación con el resto de los peces alimentados con niveles mayores de proteína, lo que muestra que un bajo nivel de proteína tiene un efecto directo sobre la cantidad de proteína somática para la construcción de músculo, lo que es similar a lo reportado

por otros autores en peces marinos de hábitos carnívoros, donde son necesarios altos niveles de proteína para lograr un crecimiento óptimo (Lazo *et al*., 1998; Maldonado-García *et al.,* 2012).

La capacidad de procesar niveles altos de lípidos en la dieta depende del hábito alimenticio de la especie, ya que generalmente los peces carnívoros pueden usar niveles de lípidos más altos que los peces omnívoros o herbívoros (Meurer *et al*., 2002; Seiliez *et al*., 2006). De tal manera en el presente estudio, se observó un mayor crecimiento de los organismos alimentado con dietas que contenían 10 y 15 % de lípidos, lo que es similar a los requerimientos de especies marinas como la lubina Europea *D. labrax*, que requiere de 12-14 % de lípidos (Peres *et al*., 1999), la lubina blanca *Atractoscion nobilis* con requerimientos de 15.5 a 18 % de lípidos (López *et al*., 2006), el chucumite *C. parallelus* con requerimientos de 10-20 % (Zhung, 2006; Wheller, 2007) el dentón común *D. dentex* de 12-17 % de lípidos (Jover *et al*., 1999; Espinos *et al.,* 2003) y el porgy rojo *P. pagrus,* que requiere 15 % de lípidos (Schuchardt *et al.,* 2008). Sin embargo, estos valores son diferentes a los reportados para la dorada *S. auratus* (Moñino *et al*., 2002), el salmón coho *Oncorhynchus kisutch* (Pokniak *et al.,* 2004), el bacalao del Atlantic *Gadus morhua* (Hatlen *et al*., 2007) y en la dorada de aleta negra *A. serda* (Rahim *et al*., 2015), ya que estas especies, al tener hábitos carnívoros, aceptan porcentajes mayores de lípidos en sus dietas de entre 20 y 30 %, lo que permite una cierta disminución de las proteínas, así como una mayor utilización de este nutriente (Valente *et al*., 2011). Aunque cabe resaltar que, para juveniles de sargo, un nivel del 20 % de lípidos disminuyó su crecimiento, lo que muestra que esta especie en este sentido puede ser considerada omnívora.

De forma complementaría, los valores de SGR y FCR de los peces alimentados con las dietas con 10 y 15 % de lípidos, son similares a lo reportado en la cobia *Rachycentron canadum* (Ruey *et al.,* 2001), y mayores a lo reportado en la dorada de aleta negra *A. serda* (Rahim *et al*., 2017). Estos resultados concuerdan generalmente en que un buen contenido energético en la dieta, provoca un menor consumo de alimento y un adecuado aprovechamiento de los nutrientes en el pez, lo que se refleja en un crecimiento acelerado (Silverstein *et al*., 1999), esta condición solo se observó en los sargos alimentados con las dietas 10 y 15 % de lípidos. De la misma manera, el WG y la ADG de los peces alimentados con estas dietas presentaron diferencia significativa con los peces alimentados con las dietas con 5 y 20 % de lípidos, lo que sugiere que los juveniles de

sargo pueden utilizar lípidos dietarios en cierto nivel como se ha registrado en otras especies de peces (Kikuchi *et al*., 2016; Wang *et al*., 2016). Así mismo, cabe señalar que los peces pequeños requieren un mayor porcentaje de lípidos en sus dietas, y conforme crecen sus requerimientos decrecen, lo cual se ha reportado en otras especies de peces (Chou *et al*., 2001; Lee *et al.,* 2003; Huerta, 2008), lo que explicaría también los resultados obtenidos en el presente estudio ya que los organismos empleados en el ensayo, presentaron una talla promedio al inicio de 62.3 ±3.3 g, por lo que se sugiere evaluar en investigaciones posteriores los requerimientos de organismos con pesos menores.

En cuanto a la composición proximal de los organismos, solo se detectó diferencia significativa entre el extracto etéreo de los peces alimentados con el 20 % de lípidos, observándose el valor más alto (28.8 %) con los peces alimentados con esta dieta. Este valor es mas alto que los reportados en *D. dentex* (Tibaldi *et al.,* 1996), pez roca *Sebastes schlegeli* (Sang *et al*., 2002), el rodaballo del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Alves *et al*., 2007). Así mismo, el menor crecimiento se registró en los peces alimentados con la dieta con 20 % de lípidos, lo que confirma que niveles por encima del requerimiento lipídico, afectan el crecimiento de los peces, al exceder las demandas energéticas (Schuchardt *et al*., 2008).

El efecto negativo de las dietas altas en lípidos sobre el crecimiento se ha reportado en dorada *S. aurata* (Company *et al*., 1999), dentón común *D. dentex* (Espinos *et al.,* 2003), cobia *Rachycentron canadum* (Chou *et al.,* 2001), *Argyrosomus regius* (Chatzifotis *et al*., 2010) y en el besugo bandeado *D. vulgaris* (Bulut *et al*., 2014). Estos autores señalan que la reducción en el crecimiento se debe a la energía excesiva que produce el consumo de alimento, y por consiguiente el crecimiento, como se observó en los juveniles de sargo alimentados con la dieta con 20 % de lípidos.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En esta investigación se proporcionó evidencias de que el sargo (*A. probatocephalus*) puede aclimatarse, madurar sexualmente y reproducirse en cautiverio, comprobándose la hipótesis planteada en el sentido de que, este resultado es diferente al alcanzado por Tucker (1998, 2004), ya que este autor no logro la reproducción en cautiverio de un lote de sargos. Los resultados obtenidos en la indución al desove con dosis menores (500 UI kg^{-1}), de la hormona gonadotropina coriónica y sérica (HGCS), son muy alentadores en el desarrollo de la biotécnia de producción de la especie. Ya que, la HGCS es de uso veterinario, y es homologa de la hormona gonadotropina coriónica humana (HGCH), empleada por otros autores para inducir otras especies de espáridos e incluso al sargo (Gordin & Zohar, 1978; Colombo *et al.,* 1989; Tucker & Barbera 1987; Tucker, 1998, 2004). Con el empleo de HGCS, se reducirían costos de producción, ya que ésta es más económica que la HGCH. Producto de los desoves inducidos con esta hormona se obtuvieron larvas viables, con las cuales fué posible lograr la descripción del desarrollo morfofuncional de su tracto digestivo.

Los resultados obtenidos en la descripción del desarrollo morfo-funcional del tracto digestivo de larvas de sargo, permitieron determinar, que el tiempo más adecuado para el destete o sustitución del alimento vivo por el inerte es a los 15 días DE, sugiriendo un destete temprano para la especie, validando de esta manera la hipótesis planteada. Esta aseveración se basa en las observaciones del desarrollo del tracto digestivo, de manera particular, el del estómago, el cual al día 10 DE, ya presentaba plegamientos y glándulas gástricas, con la consecuente secreción de pepsina. De igual manera, otros indicadores de la madurez intestinal del tracto digestivo da larvas de sargo fueron los incrementos sostenidos de la actividad enzimática de leucino-aminopéptidasa y fosfatasa alcalina. Estas condiciones permiten a las larvas, una alimentación eficiente, al momento de suministrar el alimento inerte. Al respecto estudios realizados por diferentes autores (Moyano *et al.,* 1996; Cara *et al.,* 2003; Moyano *et al*., 2005; Gisbert *et al.,* 2009; Guerreiro *et al*., 2010), describen la ontogenia enzimática digestiva hasta la transformación en cría, por lo que es recomendable realizar la descripción morfo-funcional del tracto digestivo del sargo hasta esta etapa del desarrollo.

Esta investigación muestra que, en el proceso digestivo en juveniles de *A. probatocephalus,* las proteasas ácidas pierden actividad a pH neutro y alcalinos, esta condición de pérdida de actividad es compensada por la hidrólisis de las proteasas alcalinas, que actúan en pH ácido. Estos resultados señalan que las características específicas del tracto digestivo del sargo, juegan un papel determinante en este proceso. Dichas características específicas son la presencia de ciegos pilóricos, un largo intestino y fuertes esfínteres, los cuales mantienen el alimento durante más tiempo en el tracto intestinal. Esto provoca que las proteasas alcalinas comiencen a actuar aún con pH ácido, cuando el alimento entra al largo intestino del sargo, lo cual le permite la hidrólisis y aprovechamiento de materiales vegetales. Este aspecto es muy importante en el diseño y elaboración de dietas practicas, ya que los materiales vegetales son más económicos y reducirían considerablemente los costos de producción.

En el presente estudio se encontró, que los juveniles de sargo presentaron niveles mayores de actividad en las proteasas estomacales, que en las proteasas intestinales. Por lo que, su digestión es llevada a cabo tanto por la pepsina, como por diversas proteasas alcalinas intestinales, altamente resistentes a condiciones de pH, temperatura e inhibidores. Las proteasas ácidas solo manifestaron en el zimograma una sola isoforma, que corresponde a la pepsina y las proteasas alcalinas (tripsina, quimotripsina, aminopéptidasa y carboxipéptidasas), manifestaron en el zimograma cuatro bandas con actividad, lo que permite evidenciar que, juveniles de sargo pueden ser considerados como carnívoros con tendencia a la omnivoría, a pesar de que los adultos sean omnívoros.

La condición carnívora de los juveniles de sargo fue puesta en evidencia al realizarse el ensayo de requerimientos de proteínas, ya que se observó mayor crecimiento de los organismos con dietas que contenían 40 % o más de proteína. Este nivel es similar al reportado para otras especies de peces carnívoros (Mc Googan & Gatlin, 1998; Álvarez-Gónzalez *et al.,* 2001; Silva *et al.,* 2006; Uscanga *et al.,* 2010; Maldonado-García *et al.,* 2012). Este comportamiento fue contrario a lo planteado en la hipótesis, ya que se esperaba que, como se trata de una especie omnívora, sus requerimientos de proteína fueran menores. Sin embargo, se esperaría que sus requerimientos en proteína se reduzcan gradualmente, a medida que los organismos crecen. Para corroborar esta apreciación, se recomienda realizar evaluaciones considerando diferentes rangos

de talla.

Los resultados referentes a los requerimientos de lípidos en juveniles de sargo indican, un mayor crecimiento en los organismos alimentados con dietas que contenían 10 y 15 % de lípidos, similar a lo reportado para otras especies de peces omnívoros (Jover *et al*., 1999; Schuchardt *et al*., 2008; Huerta, 2008). En este sentido el sargo se comportó como una especie omnívora, validando la hipótesis propuesta, ya que sus requerimientos de lípidos fueron relativamente bajos en comparación a lo requerido por otras especies de hábitos carnívoros (Guzmán, 2003), que aceptan porcentajes mayores de lípidos en sus dietas (de 20 al 30 %). Sin embargo, esta condición no se observó en juveniles de sargo, ya que su crecimiento disminuyó con la dieta con 20 % de lípidos.

Estos resultados indican, que los juveniles de sargo requieren para lograr un buen crecimiento, de dietas que contengan 40 % o más de proteína y de 10 a 15 % de lípidos, para satisfacer las necesidades nutricionales de la especie. Como no hubo diferencia significativa entre los organismos alimentados con los niveles de proteína con 40 % o más, se propone el empleo de un nivel de proteína en la dieta de juveniles de sargo con un 40 %, ya que cualquier exceso se considera inútil, tanto biológica como económicamente, debido a que es importante minimizar la cantidad de proteína (De Silva & Anderson, 1995; NRC, 2011; Deng *et al*., 2011; Ahmed & Maqbool, 2017). Así mismo, se propone el uso de un nivel de lípidos del 10%, ya que también es un elemento costoso (Dong *et al*., 2014). Estos niveles bajos de proteína y de lípidos requeridos por juveniles de sargo, permitiran elaborar dietas practicas de bajo costo.

Para proponer dietas que cumplan con estos requerimientos, es de suma importancia la evaluación de la digestibilidad *in vitro* de diferentes ingredientes alimenticios, con la finalidad de seleccionar con base a su grado de hidrólisis y de aminoácidos totales libres, los más idóneos (biodisponibles y digeribles) para su empleo en la formulación de dietas balanceadas. Al respecto, los resultados obtenidos señalan que, la harina de cabeza de camarón y la harina de res, como harinas de origen animal y el gluten de maíz, como harina de origen vegetal, se proponen como los ingredientes mas adecuados para formular dietas para juveniles de sargo, ya que presentaron los valores más altos de GH y aminoácidos totales libres. Estos resultados son consistentes con los reportes que señalan que las crías y juveniles de esta especie, consumen en

su dieta una buena cantidad de crustáceos, y los adultos se alimentan también de plantas (Cutwa & Turingan 2000; Castillo-Rivera *et al.,* 2007). Por lo tanto se comprueba, que este organismo dispone de la batería enzimática digestiva, para una adecuada hidrólisis de este tipo de harinas. Así mismo, es importante señalar que la harina de cabeza de camarón y el gluten de maíz son insumos de bajo costo, los cuales valdría la pena evaluar incorporados en dietas de engorda en futuras investigaciones.

Esta investigación logró aportar elementos sobre la aclimatación y reproducción en cautiverio de la especie, para la obtención de larvas viables, además se describió la fisiología enzimática digestiva de larvas y de juveniles de sargo (*A. probatocephalus)*, a fin de determinar los requerimientos nutricionales escenciales en proteínas y lípidos, para la formulación de dietas artificiales y la propuesta de ingredientes alimenticios idóneos para su elaboración. Es necesario profundizar en temas tales como; la producción de crías de sargo en laboratorio, evaluar dietas de destete y de engorda, en las que se consideren diferentes contenidos de aminoácidos y ácidos grasos, así como la evaluación de diferentes ingredientes proteícos, por medio del coeficiente de digestibilidad aparente, etc.

REFERENCIAS

Ahmed, I. & A. Maqbool. 2017. Effects of dietary protein levels on the growth, feed utilization and haemato-biochemical parameters of freshwater fish, *Cyprinus carpio* var. specularis. Fish Aqua Journal. 8: 187-198.

Alarcón, F.J., M. Díaz, F.J. Moyano & E. Abellan. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiol Biochem. 19: 257-267.

Alarcón, F.J., F.J. Moyano & M. Díaz. 2001. Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. Aquaculture International. 9**:** 255-267.

Alarcón, F.J., F.J. Moyano & M. Díaz. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-STAT system. Journal of the Science of food and Agriculture. 82: 697-704.

Alencar, B.R., M.M Biondi, M.V.L Paiva, B.L. Carvalho-Junior & S.R. Bezerra. 2003. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. Braz. J. Food Technol. 6 (2): 279-284.

Alliot, E., A. Pastoureaud & J. Trellur 1977. Evolution des activities enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*)**.** Variations des proteinogrammes et des zymogrammes. Colloq Int Cent Nat Rech Sci. 4: 85-91.

Álvarez-González, C.A., R. Civera-Cerecedo, J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta & T. Grayeb-Del Alamo. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. Aquaculture. 194: 151-159.

Álvarez-González, C.A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis de Doctor en ciencias. CICIMAR, La Paz, B.C.S., México. 180 pp.

Álvarez-González, C.A., M. Cervantes-Trujano, D. Tovar-Ramírez, D.E. Conklin, H. Nolasco, E. Gisbert & R. Piedrahita. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiol Biochem. 31: 83-93.

Álvarez-González, C.A., F.J. Moyano, R. Civera-Cercedo, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Palabrax maculatofasciatus*) I. Biochemistry analysis. Fish Physiol. Biochem. 34: 373-384.

Álvarez Lajonchére, L. & O. Hernández. 1991. Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro de América Latina y el Caribe: Diseño, Operación y Tecnología. Word Aquaculture Society. Baton Rouge, USA, 424 pp.

Álvarez Vela, A.C. 2009. Análisis de las pesquerías de la laguna de Tamiahua, México aplicando un enfoque espacio-temporal. Tesis maestría, Instituto de Ciencias marinas y pesquerías, Universidad Veracruzana, Boca del Río, Ver. México. 121 pp.

Alves, M.D., L.M.P. Valente & S.P. Lall. 2007. Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. Aquaculture. 263:150-158.

Amirkolaie, A.K., J.L. Leenhouwers, J.A.J Verreth & J.W. Schrama. 2005. Type of dietary fibre (soluble *versus* insoluble) influences digestion, faeces characteristics and faecal waste production in Nile Tilapia (*Orechromis niloticus L.*). Aquacult Res. 36: 1157-1166.

Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. Journal Gen. Physiol. 22:79-89.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official methods of analysis, 17 th edition. Arlington, Virginia, USA. 2200 pp.

Applebaum, S.L., R. Pérez, J.P. Lazo & G.J. Holt. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Physiology and Biochemistry. 25: 291-300.

Arce, U.E, & F.J. Luna. 2003. Efecto de dieta con diferente contenido proteico en las tasas de crecimiento de crías del bagre de las balsas *Ictalurus balsanus* (pisces: Ictaluridae) en condiciones de cautiverio. Revista AquaTIC. 18: 39-47.

Asociación Empresarial de Acuacultura de España (APROMAR). 2017. La Acuicultura en España, 2017. APROMAR Unión Europea, Gobierno de España, http://www.apromar.es/sites/default/files/2017/informe/APROMAR_Informe_ACUICULTURA_2017, pdf. (consultado el 6 de diciembre de 2017).

Atienza, M.T., S. Chatzifotis & P. Divanach. 2004. Macronutrient selection by sharpsnout sea bream *(Diplodus puntazo).* Aquaculture. 232: 481-491.

Baglole, C.J., H.M. Murray & G.P. Goff. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. Journal Fish Biol. 51(1): 120-134.

Ballestrazzi, R., D. Lanari, E.D Agaro & A. Mion. 1994. The effect of dietary level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass *Dicentrarchus labrax.* Aquaculture. 127: 197-206.

Basurto-Hernández, J.M. & L. Cruz-Barrera. 2000. Estudio preliminar sobre la inducción al desove de sargo *Archosargus probatocephalus*; (Walbaum, 1972), mediante el uso de gonadotropina coriónica humana, en el Instituto Tecnológico del Mar de Boca del Río, Veracruz. Tesis Licenciatura ITMAR No.1. Boca del Río,Veracruz. México. 75 pp.

Beckman, D.W., A.L Stanley, J.H Render & C.A. Wilson. 1991. Age and growth-rate estimation of sheepshead, *Archosargus probatocephalus* in Louisiana waters using otoliths. Fishery Bulletin. 89: 1-8.

Behal, F.J., B. Asserson, F. Dawson & J. Hardman. 1965. A study of human tissue aminopeptidase components. Archives of Biochemistry and Byophysic. 111: 335-344.

Ben, K.H., K. Jellouli, N. Souissi, S. Ghorbel, A. Barkia & M. Nasri. 2011. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*).

Fish Physiol Biochem 37:123-133.

Bergmeyer, HV. 1974. Phosphatases methods of enzymatic analysis, vol 2. Academic Press, New York. 145 pp.

Bester & Robins. 2005. Biological profiles: sheepshead. Ichthyology: Education-Biological profiles. Florida museum of natural history University of Florida www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/Sheepshead/Sheepshead.html. (consultado el 15 de junio de 2016).

Bezerra, S.R., J.F.E. Lins, B.R. Alencar, M.G.P. Paiva, E.C.M. Chaves, C.B.L. Coelho & B.L. Carvalho. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry. 40:1829-1834.

Bobe, J. & C. Labbé. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology. 165: 535-548.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochemistry. 72: 248-257.

Buddington, R.K. & J.M. Diamond. 1986. Aristotle revisited: The function of pyloric caeca in fish. Proceedings of the National Academy of Sciences. 83: 8012-8014.

Butul, M., M. Yaguit, S. Ergün, O.S. Kesbiç, U. Acar, N. Gültepe, M. Karga, S. Yilmaz & D. Güron. 2014. Evaluation of dietary protein and lipid requirements of two-banded seabream (*Diplodus vulgaris*) cultured in a recirculating aquaculture system. Aquaculture International. 22: 965-973.

Cahu, C.L. & J.L. Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp Biochem Physiol. 109A: 213–222

Cahu, C.L. & J.L. Zambonino-Infante. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal

digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. Fish Physiol. Biochem. 14: 431-437.

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

Canino, M.F. & K.M. Bailey. 1995. Gut evacuation of walleye pollock larvae in response to feeding conditions. Journal Fish Biol. 46**:** 389-403.

Cao, M.J., W.Q. Chen, C.H. Du, A. Yoshida, W.G. Lan, G.M. Liu, W.J. Su. 2011. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Comp Biochem Physiol. 158B: 259-265.

Cara, J.B., F.J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Díaz & M. Yúfera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. Journal of Fish Biology. 63: 48-58.

Carpenter, K.E, T. MacDonald, B. Russell, M. Vega-Cendejas. 2014. *Archosargus probatocephalus.* The IUCN Red List of Threatened Species. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20143.RLTS.T170223A1296293. (consultado el 10 de agosto de 2015).

Carter, C.G., E. Mente, R. Barnes & I. Nengas. 2012. Protein synthesis in gilthead sea bream: response to partial fishmeal replacement. British Journal of Nutrition. 108: 2190-2197.

Castillo-Rivera, M., R. Zárate-Hernández & I.A. Salgado-Ugarte. 2007. Hábitos alimenticios de juveniles y adultos de *Archosargus probatocephalus* (Teleostei: Sparidae) en un estuario tropical de Veracruz. Hidrobiológica. 17(2): 119-126.

Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, F.L. García-Carreño & M.A. Navarrete-Del Toro. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*S. sagax caerulea*). Comparative Biochemistry and Physiology. B140: 91-98.

Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, F.L. García-Carreño, M.A. Navarrete-Del Toro &

M. Félix-López. 2006. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*S. sagax caerulea*). Food Chemistry. 99(2): 252-259.

Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, M.E. Lugo-Sánchez, G. García-Sánchez & I.E. Quintero-Reyes. 2009. Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. Food Chemistry. 112: 634-639.

Castranova, D.A., W. King, L.C. Woods. 2005. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. Aquaculture. 246: 413-422.

Chakvarti, T., S. Laha & E. Roy. 1967. Handbook of metods of aplied statistic, Voume I, John Wiley and sons. Pp. 392-394.

Chatzifotis, S., M. Panagiotidou, N. Papaioannou, M. Pavlidis, I. Nengas & C.M. Constantinos. 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum matabolites of maeger (*Argyrosomus regius*) juveniles. Aquaculture. 307: 65-75.

Chen, B.N., G.Q. Jian, S.K. Martin, G.H. Wayne & M.C. Steven. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yel- lowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture. 256: 489–501.

Chen, H.Y., & J.C. Tsay. 1994. Optimal dietary protein level for the growth of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed semipurified diets. Aquaculture. 119: 265-271.

Chiu, S.T. & Pan B.S. 2002. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*) fed with floating feed. Aquaculture. 205: 141-156.

Cho, S.H., J.Y. Jo, & D.S. Kim. 2001. Effects of variable feed allowance whith constant energy and ratio of energy to protein input on the growth of common carp *Cyprinus carpio* L.

Aquaculture Research. 32: 349-356.

Chong, A.S.C., R. Hashim, L. Chow-Yang & A.B. Ali. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture. 203: 321-333.

Chou, B.S., & S.S. Shiau. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for growth of juvenile hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureos*. Aquaculture. 143: 185-195.

Chou, R.L., M.S Su & H.Y. Chen. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentrum canadum*). Aquaculture. 193: 81-89.

Civera, R. & Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture. 77: 145-156.

Cohen, T., A. Gertler & Y. Birk. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): 1. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. Comp Biochem Physiol. 69 B(3): 639-646.

Colombo, L., A. Francescon, A. Barbaro, P. Belvedere & P. Melotti. 1989. Induction of spawning in the Gilthead sea bream*, Sparus aurata L*., by elevation of the water temperature and salinity and by HCG LH-RH analogue treatments. Rivista Italiana di Acquacoltura. 24: 187-196.

Company, R., J.A. Calduch-Giver, S. Kaushik, J. & Pérez-Sánchez. 1999. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream utilization, body composition metabolites of meager (*Argyrosomus regius*) juveniles. Aquaculture. 307: 65-70.

CONAPESCA-SAGARPA. **2015**. Estadísticas pesqueras. www.conapesca.sagarpa.gob.mx (consultado el 15 junio de 2015).

Concha-Frías, B., C.A. Alvarez-González, M.G. Gaxiola-Cortés, A.E. Silva-Arancibia, P.H. Toledo-Agüero, R. Martínez-García, R. Camarillo-Coop, L.D. Jiménez-Martínez & J. Arias-Moscoso. 2016. Partial Characterization of digestive proteases in the common Snook *Centropomus undecimalis*. Int J Biol. 8: 1-11.

Cousin, J.C.B., F. Baudin-Laurencin & J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed y fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. J Fish Biol. 30: 15-33.

Coutinho, F., H. Peres, I. Guerreiro, P. Pousão-Ferreira, & A. Oliva-Teles. 2012. Dietary protein requirement of sharp snout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles. Aquaculture. 356: 391-397.

Cuenca-Soria, C. A., C.A. Álvarez-González, J.L. Ortiz-Galindo, H. Nolasco-Soria, D. Tovar-Ramírez, R. Guerrero-Zárate, A. Castillo-Domínguez, M.A. Perera-García, R. Hernández-Gómez & E. Gisbert. 2014. Partial characterisation of digestive proteases of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. Fish Physiol Biochem. 40: 689-699.

Cutwa, M. & R.G. Turingan. 2000. lnterlocality variation in feeding biomechanics and prey use in *Archosargus probatocephalus* (Teleostei: Sparidae) with implications for the ecomorphology of fishes. Environmental Biology of Fishes. 59: 191-195.

Del Mar, E.G., C. Largman, J.W. Broderick & M.C. Geokas. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal Biochem. 99: 316-320.

Deng, D., Z. Yong, W. Dominy, R. Murashige, & R.P. Wilson. 2011. Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. Aquaculture. 316: 25-30.

De Silva, S.S, & T.A. Anderson. 1994. Fish Nutrition in Aquaculture. Vol. 1. Springer Netherlands. 320 pp.

De Silva, S.S. 2006. Reducción de costos en la alimentación acuícola: ¿Es el uso de Programas de alimentación combinada la respuesta para la práctica Semi-Intensiva? Aquaculture. 4: 1-16.

Díaz-López, M., F.J. Moyano, F.J. Alarcón, F.L. García-Carreño & M.A. Navarrete del Toro. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. Comp Biochem and Physiol. 121B: 369-377.

Dimes, L.E., N.F. Haard, F.M. Dong, B.A. Rasco, I.P. Forster, W.T. Fairgrieve, R. Arndt, R.W. Hardy, F.T. Barrows & D.T. Higgs. 1994. Estimation of protein digestibility. II. In vitro assay of protein in salmonid feeds. Comp Biochem and Physiol. 108: 363-370.

Dong, G., X. Zhu, H. Ren, B. Nie, L. Chen, H. Li, & B. Yan. 2014. Effects of oxidized fish oil intake on tissue lipid metabolism and fatty acid composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture Research. 45: 1867-1880.

Dunn, B.M. 1989. Determination of protease mechanism. In R.J. Beynon, J.S. Bond (Eds.), Proteolytic enzymes: A practical approach. IRL Press. Oxford, England. Pp. 57-81

El-Husseiny, O.M., A.K.I Elhammady & S.M. Tolba. 2013. Lipid and protein utilization by gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under flowthrough system with regard to environmental impact. J Arabian Aquaculture Soc. 8: 307-320.

Erlanger, B., N. Kokowsky & W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archiv Biochem Biophysic. 95: 271-278.

Espinos, F.J., A. Tomas, L.M. Pérez, S. Balasch, & M. Jover. 2003. Growth of dentex fingerlings (*Dentex dentex*) fed diets containing different levels of protein and lipid. Aquaculture. 218: 479-490.

Essed, Z., I. Fernández, F.J. Alarcón & F.J. Moyano. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). Bol Inst Esp Oceanogr. 18(1-4): 99-107.

Ezquerra, J.M., F.L. García-Carreño, R. Civera & N.F. Haard. 1997. pH-STAT method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannanei*). Aquacuture. 157: 251-262.

FAO. 2011. Desarrollo de la acuacultura 4; Enfoque ecosistémico de la acuicultura. Orientaciones Técnicas para la pesca responsable No. 5 Sul. 4. FAO. Roma, Italia. 60 pp.

FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012, ONU-FAO. Roma, Italia. 231

pp.

Faulk, C.K. & G.J. Holt. 2008. Biochemical composition and quality of captive spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. Aquaculture. 279: 70-76.

Fernández-Palacios, H., M. Izquierdo, L. Robaina, A. Valencia, M. Salhi & D. Montero. 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broostock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 148: 233-246.

Figueira, W.F. & F.C. Coleman. 2010. Comparing landing of United States Recreational Fishery Sectors. Bulletin of Marine Science. 86(3): 499-514.

Folk, J.E. & E.W. Schirmer. 1963. The Porcine Pancreatic Carboxypeptidase A System: I. Three forms of the active enzyme. Journal of Biological Chemistry. 238: 84-94.

Fu, X., C. Xue, B. Miao, Z. Li, X. Gao & W. Yang. 2005. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): high alkaline protease activity. Aquaculture. 246. 321- 329.

Furné, M., M.C Hidalgo, A. López, M. García-Gallego, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezainé & A. Sanz. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* a comparative study. Aquaculture. 250: 391-398.

García-Carreño, F.L., L.E. Dimes & N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous protease inhibitors. Anal Biochem. 214: 65- 69.

García-Carreño, L.F., C. Albuquerque-Cavalcanti, A.M Navarrete del Toro & E. Zaniboni-Filho. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects or protein quality. Comp Biochem Physiol. B132: 343-352.

Gawlicka, A., B. Parent, M.H. Horn, N. Ross, I. Opstad & O.J. Torrisen. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*:

indication of readiness for first feeding. Aquaculture. 184: 303-314.

Gildberg, A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. Comp Biochem Physiol. B91(3): 425-35.

Gisbert, E., R.H. Piedrahita & D.E. Conklinm. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture. 232: 455-470.

Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis & A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture. 287: 381-387.

GSMFC, 2006. The sheepshead fisheries, pub. No. 143 of The Gulf of Mexico, United States. A Fisheries profile, by The sheepshead technical task force. Vanderkooy, Ocean Spring. Mississippi, USA. 143 pp.

Goos, H.J. & D. Costen. 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. Molecular and Cellular Endocrinology. 197: 105-116.

Gordin, H. & Y. Zohar. 1978. Induced spawning *Sparus aurata* (L.) by means hormonal treatments. Annales de biologie animale, Biochemie Biophysique. 18: 985-990.

Guerreiro, I, M. de Vareilles, P. Pousão-Ferreira & L. Vera-Rodrigues Ribeiro. 2010. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). Aquaculture. 300: 194-205.

Guerrero-Zárate, R., C.A. Alvarez-González, M.A. Olvera-Novoa, N. Perales-García, C.A. Frías-Quintana, R. Martínez-García & W.M. Contreras-Sánchez. 2014. Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. Fish Physiol Biochem. 40:1021-1029.

Guzmán, C.V. 2003. Efecto de diferentes niveles de proteínas y lípidos de las dietas en el crecimiento de adultos de *Galaxias maculatus* (JENYNS, 1842). Tesis de licenciatura.

Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. 56 pp.

Hai-ying, W., W. Yue-jun, W. Qing-yin, X. Chang-hu & S. Mi. 2006. Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Physiol Biochem. 32:179-188.

Hatlen, B., S.J. Ahelland & H.B. Grisdale. 2007. Energy and nitrogen partitioning in 250 g Atlantic cod *Gadus morhua L*. given graded levels of feed whit different protein and lipid contend. Aquaculture. 270: 167-177.

Hepher, B. 1993. Nutrición de peces comerciales en estanques. Editorial LIMUSA. México, D.F. 193 pp.

Hidalgo, M.C., E. Urea & A. Sanz. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutricional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture. 170: 267-283.

Hjelmeland, K., I. Huse, T. Jorgensen, G. Molvik & J. Raa. 1983. Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. Flodevigen Rapp. 3:1-17.

Hollander & Woffe. 1999. Nonparametric Statistic Methods. 2nd ed. Wiley Interscience, Hardcover, New York, USA. 162 pp.

Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. J. World Aquac. Soc. 24: 225-230.

Holt, G. J., C.K. Faulk & M.H. Schwarz. 2007. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. Aquaculture. 268: 181-187.

Hotelling, H. 1988. Golden oldies. Classical articles from the world Statistics and Probability the Teaching of Statistics. Statistic Science 3(1): 63-71.

Huerta, O.M. 2008. Requerimientos de lípidos en larvas y juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa Tabasco, México.126 pp.

INAPESCA, 2012. http://www.inapesca.gob.mx/portal/165/Sistemaderniipa, (consultado el 15 de junio de 2015).

Jennings, C.A. 1985. Species profiles, life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico) sheepshead. Fish and Wildlife Service Biological Report 82. U.S. Army Corps of Engineers Vicksburg, Mississippi, USA. 115 pp.

Jiménez-Martínez, L.D., C.A. Álvarez-González, D. Tovar-Ramírez, G. Gaxiola, A. Sánchez-Zamora, F.J. Moyano, F.J. Alarcón, G. Márquez-Couturier, E. Gisbert, W.M. Contreras-Sánchez, N. Perales-García, L. Arias-Rodríguez, J.R. Indy, S. Páramo-Delgadillo & I.G. Palomino-Albarrán. 2012. Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis)*. Fish Physiol Biochem 38: 441-454

Jobling, M. 1995. Environmental Biology of Fishes. Chapman & Hall. London, England. 455 pp.

Jobling, M. 2012. Nutrient requirement of fish and shrimp national Research Council (NRC). The National Academic Press, Washington D.C., USA. 376 pp.

Jonas, E., M. Ragyanski, J. Olah & L. Borros. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, VAL) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. Aquaculture. 30: 145-154.

Jones, P.L., S.S. De Silva, & D.B. Mitchell. 1996. The effect of dietary protein source on growth and carcass composition in juvenile Australian freshwater crayfish. Aquaculture International. 4: 361-367.

Jover, M., F. Riera, A. Grau, E. Pastor, F.J Espinos & L. Pérez. 1999. Resultados preliminares de crecimiento del Denton (*Dentex Dentex*) en jaulas flotantes alimentado con piensos extrusionados de diferente relación proteína/lípidos. Revista AquaTIC. 7: 1-8.

Jun-Sheng, L., L. Jian-Lin & W. Ting-Ting. 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in

the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Fish Physiol Biochem. 32: 295-303.

Kawai, S. & S. Ikeda. 1973. Studies on digestive enzymes of fishes. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 39: 819-823.

Kennedy, J., A.J. Geffen & R.D.M. Nash. 2007. Maternal influences on egg and larval characteristics of plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Journal of Sea Research. 58: 65-77.

Kikuchi, K., T. Furuka, N. Iwata, K. Onuki, & T. Noguchi. 2016. Effect of dietery lipid levels on the growth, feed utilization, body composition and blood characteristics of tiger puffer *Takifugu rubripes.* Aquaculture. 298: 111-117.

Kim, K.W., X.J. Wang & S.C. Bai. 2002. Optimum dietary level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). Aquaculture Research. 33: 673-679.

Kjørsvik, E., K. Pittman & D. Pavlov. 2004. From fertilization to the end of metamorphosis-functional development. In: Moksness, E., E. Kjørsvik & Y. Olsen (Eds.). Culture of cold-water marine fish. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. Pp. 204-278.

Klahan, R., N. Areechon, R. Yoonpundh & A. Engkagul. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Kasetsart J. Nat. Sci. 43: 143-153

Klomklao, S. 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin J Sci Technol. 30(1): 37-46.

Klomklao, S, H. Kishimur, M. Yabe & S. Benjakul. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). Comp Biochem Physiol. B147(4): 682-689.

Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles implications and applications to formulated diets. Aquaculture. 200: 181-201.

Köprücü, K. & Y. Özdemir. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 250: 308-316.

Kumar, S., F.L. García-Carreño, R. Chakrabarti, A.M. Navarrete del Toro & J.H. Córdova-Murueta. 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla, Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. Aquaculture Nutrition. 13: 381-388.

Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. The Journal of General Physiology. 30: 291-310.

Kurokawa, T. & T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 141: 267-276.

Kuz'mina, V. V. & A. P. Strel'nikova. 2008. Influence of diurnal rhythms of feeding during intestine total amylolytic activity and activity of alkaline phosphatase in juvenile fish. Ecological Physiology and Biochemistry. Vol 1(2): 182-191.

Kvale, A., A. Mangor-Jensen, M. Moren, M. Espe & K. Hamre. 2007. Development and characterization of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Aquaculture. 264: 457-468

Lan, C.C. & B.S. Pan. 1993. In vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 109: 59-70.

Lauff, M. & R. Haufer. 1984. Protelytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture. 37: 335-346.

Lazo, J.P., D.A. Davis, & C.R. Arnold. 1998. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus*.

Aquaculture. 169: 225-232.

Lazo, J., 2000. 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. Mérida, Yucatán, Mexico, 19-22 Noviembre, 2000. 56-67 pp.

Lazo, J., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera & C.R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 265: 194-205.

Lazo, J., M.J. Darias & E. Gisbert. 2011. Ontogeny of the digestive tract, 5-46. In: Holt, G.J. (Ed.). Larval Fish Nutrition. First Edition. Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. Pp. 5-46.

Lazzari, R., N.J João Radünz, P.F. Araújo, L.V Lucia, A. Pretto & G.C. Rosa. 2010. Protein sources and digestive enzyme activities in jundiá (*Rhamdia quelen*). Science Agriculture 67 (3): 259-266.

Lee, S.M., I.G. Jean, & J.Y. Lee. 2003. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rock fish *Sebastes schlegeli.* Aquaculture. 211: 227-239.

Lellis Dibble, K.A., K.E. McGlynn & T.E. Bigford. 2008. Estuarine fish and shellfish species in U.S. commercial and recreational fisheries: Economic value as an incentive to protect and restore estuarine habitat. U.S. Dep. Commerce, NOAA Tech. Memo. NMFS-F/SPO-90. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). 94 p. http://www.nmfs.noaa.gov/habitat/habitatprotection/wetlands/index5.htm. (consultado el 10 de abril de 2017).

Lehninger, A.L. 1995. Bioquímica. OMEGA. Barcelona, España. 1198 pp.

Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2005. The shape of the lipid vesicle is a potential marker for egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, and in the sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. Aquaculture. 246: 423-435.

Lahti, K. & N. Lower. 2000. Effects of size asymmety on agression and food acquisition in Arctic charr. Journal of fish Biology 56: 915-922.

Laine, P. & M. Rajasilta. 1999. The hatching success of Baltic herring eggs and its relation to female condition. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 237: 61-73.

Li, X., Y. Jiang, W. Liu, & X. Ge. 2012. Protein-sparing effect of dietary lipid in practical diets for blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings: effects on digestive and metabolic responses. Fish Physiol Biochem. 38: 529-541.

Liu, Z.Y., Z. Wang, S.Y. Xu & L.N. Xu. 2008. Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Aquaculture Nutrition. 14: 31-39.

López-López, E., M. Salgado-Mejía & S.A. Guzmán-Del Proo.1991. Un análisis estacional de la ictiofauna de la laguna de Tampamachoco, Ver., y sus hábitos alimentarios. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 34: 81-107.

López, L.M., A.L Torres, E. Durazo, M. Drawbridge, P. Dominique & Bureau. 2006. Effects of lipid on growth and feed utilization of white seabass (*Atractoscion nobilis*) fingerlings. Aquaculture. 253: 557-563.

Luczkovich, J.J. & E.J. Stellwag.1993. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish, *Lagodon rhomboides*: Size-related changes in diet and microbial abundance. Marine Biology. 116(3): 381-388.

Lundsted, L. M., J.F. Melo & B.G. Moraes. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of suluriformes pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) in response to different diet composition. Comp Biochem and Physiol Biochem Mol Biol. 137(3): 331-339.

Luo, Z., Y.J. Liu, K.S Mai., L.X Tian, D.H Liu & Y. Tan. 2004. Optimal dietary protein requirement of grouper, *Epinephelus coioides* juveniles fed isoenergetic diets in floating net cages. Aquaculture Nutrition. 10(4): 247-252.

Lupatsch, I., G.W. Kissil & D. Sklan. 2003. Defining energy and protein requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to optimize feeds and feeding regimes. Isr J Aquac Bamidgeh 55(4): 243-257.

Maldonado-García, M., J. Rodríguez-Romero, M. Reyes-Becerril, C.A Álvarez-González, R. Civera-Cerecedo & M. Spanopoulos. 2012. Effect of varying dietary protein levels on growth, feeding efficiency, and proximate composition of yellow snapper, *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869). Lat Am Aquat Res 40(4): 1017-1025.

Maraux, S., D. Louvard & J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. Biochimica et Biophysica Acta. 32: 282-295.

Martínez, M.I., F.J. Alarcón, M.R. Dehesa & A. García. 1997. Evolución del equipamiento enzimático digestivo a lo largo del desarrollo larvario del dentón (*Dentex dentex*). En: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (ed.). Actas VI Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, septiembre 4-8 de 1997. Pp. 509-514

Mateen, A., A. Ghaffar, G. Abbas, S. Ferrando & L. Gallus. 2016. Body composition and fatty acid profile of carps under the influence of rice polish and pond fertilization. Pakistan J. Zool., 48, 1263- 1267.

Mathews, C.K. & K.E. Van Holde. 1998. Bioquímica, Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. 156 pp.

Matlock, G.C. & M.A. García. 1983. Stomach contents of selected fishes from Texas bays. Contributions in Marine Science 26: 95-110.

Matus-de-la-Parra, A., A. Rosas, J.P. Lazo & M.T. Viana. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. Fish Physiol Biochem 33: 223-231.

McDonough, C.J., C.A. Wenner & W.A. Roumillat. 2011. Age, growth, and reproduction of sheepsheads in South Carolina, Marine and Coastal Fisheries. Dynamics Management and Ecosystem Science 3(1): 366-382.

McGoogan, B.B., & D.M. Gatlin III. 1998. Metabolic requirements of red drum, *Sciaenops ocellatus*, for protein and energy based on weight gain and body composition. Journal Nutrition. 128: 123-129.

Merino-Contreras, M.L., F. Sánchez-Morales, M.L. Jiménez- Badillo, C.A. Álvarez- González, C.G. Meiners-Mandujano & E. Peña-Marín. 2018. Aclimatación en cautiverio del sargo *Archosargus probatocephalus* (Perciformes: Sparidae). Ecosist Recur Agropec. 5(15): 511-521.

Meurer, F., C. Hayashi, W.R Boscoso & S.C. Martins. 2002. Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus,* L. Revista Brasileña de Zootecnia. 31(2): 566-573.

Mongile, V., A. Bonaldo, R. Fontanilla, L. Mariani, A. Badiani, E. Bonvini & L. Parma. 2014. Effect of dietary lipid level on growth and feed utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. Italian Journal Anim. Sci.13: 30-34.

Montgomery, J.L. & T.E. Targett. 1992. The nutritional role of seagrass in the diet of the omnivorous pinfish *Lagodon rhomboides* (L.). J Exp Mar Bio Ecol. 158(1): 37-57.

Moñino, A., A. Tomás, M. Fernández, R. Lázaro. L. Pérez, F.J Espinós, A. Tiana & M. Jover. 2002. Estudio del crecimiento, del aprovechamiento nutritivo y de la productividad económica de la dorada *Sparus auratus* L., 1758 alimentada con piensos comerciales de diferente contenido en proteína y lípidos. Boletín Instituto Español de Oceanografía. 18: 275-280.

Moyano, F.J., M. Diaz, F.J. Alarcón & M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish.

Physiol. Biochem. 15: 121-130.

Moyano, F.J., F.J. Alarcón & M. Díaz. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. Comparative Biochemistry and Physiology. 5: 135-143.

Moyano, F.J., A.M. Barros, A. Prieto, J.P. Cañabate & S. Cárdenas. 2005. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). Aquatic. 22: 39-47.

Moyle, P.B. & J.J. Cech. 2000. Fishes: An Introduction to Ichthyology. 4th Ed. Prentice Hall. USA. 612 pp.

Munilla-Moran, R. & J.R. Stark.1990. Metabolism in marine flatfish VI. Effect of nutritional state of digestion in turbot, *Scophtalmus maximus* (L.). Comp Biochem Physiol. 95B: 625-634.

Munyandorero, J., M.D. Murphy & T.C. MacDonald. 2006. An assessment of the status of sheepshead in Florida waters through 2004. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Marine Research, Florida, USA. 113 pp.

Murashita, K., H. Fucoda, N. Takahashi, N. Hosomi, H. Matsunari & T. Yamamoto. 2015. Effect of feed ingredients on digestive enzyme secretion in fish. Bulletin Fishery Research agenda. 40: 69-74.

Nalinanon, S., S. Benjakul, W. Visessanguan & H. Kishimura. 2008. Tuna Pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.). J Food Sci. 73C: 413-419.

Nalinanon, S., S. Benjakul & H. Kishimura. 2010a. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). Food Chemistry 121: 49-55.

Nalinanon, S., S. Benjakul & H. Kishimura. 2010b. Purifcation and biochemical properties of

pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Eur Food Res Technol 231: 259-269.

NMFS, (National Marine Fisheries Service). 2006. Marine Recreational Fisheries Statistics Survey. NMFS Statistics and Economics Division. Available: http://www.st.nmfs.noaa.gov/st1/recreational/index.html. (consultado el 12 junio de 2015).

Nankervis, L. & P.C. Southgate. 2006. An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microbond diets for Barrramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture. 257: 453-464.

NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirement of fish. National Academic Press, Washington DC, USA. 114 pp.

NRC (National Research Council). 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington DC, USA. 221 pp.

Natalia, Y., R. Hashim, A. Ali & A. Chong. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). Aquaculture. 233: 305-320.

Okuzawa, K., T. Takebe, N. Hirai & K. Ikuta. 2015. Status of resource enhancement and sustainable aquaculture practices in Japan. In: Romana-Eguia MRR, Parado-Estepa FD, Salayo ND, Lebata-Ramos MJH (Eds.) Resource Enhancement and Sustainable Aquaculture Practices in Southeast Asia: Challenges in Responsible Production of Aquatic Species, Aquaculture Dept., Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan Iloilo, Philippines. 41-52 p.

Ogburn, M.V. 1984. Feeding ecology and the role of algae in the diet of sheepshead *Archosargus probatocephalus* (Pisces: Sparidae) on two North Carolina jetties. M.S. Thesis, University of North Carolina, Wilmington, NC, USA. 64 pp.

Olsson, C. & S. Holmgren. 2001. The control of gut motility. Com Biochem Physiol. 128A: 481-503.

Oña, C., F.J. Alarcón, M. Díaz & E. Abellán. 2003. Estudio comparativo de la degradación *in vitro* de proteínas por las proteasas estomacales de Denton (*Dentex dentex*), Pargo (*Pagrus pagrus*) y el hibrido Dentex x Pagrus. Universidad de Zaragoza (eds.) II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), Zaragoza, España, 1 septiembre-30 octubre, 2003. Pp. 540-549.

Oña, C., F.J. Alarcón, M. Díaz & E. Abellán. 2005. Hidrólisis proteica in vitro de materias primas de diferente calidad por las proteasas intestinales de tres espáridos. Universidad de Almería, España (eds). X Congreso Nacional de Acuicultura, Almería España, mayo 7-10, 2005. Pp. 232-233.

Ozório, R.O.A., L.M.P Valente, P. Pousao-Ferreira & A. Oliva-Teles. 2006. Growth performance and body composition of White seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets whit different protein and lipid levels. Aquaculture Research. 37: 255-263.

Ozório, R.O.A., L.M.P Valente, S. Carriera, P. Pousao-Ferreira, A. Damaceno-Oliveira, C. Escorcio & A. Oliva-Teles. 2009. Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-babded seabream (*Diplodus vulgaris*) juveniles. Aquaculture Nutrition.15: 85-93.

Pattillo, M.E., T.E. Czapla, D.M. Nelson & M.E. Monaco. 1997. Distribution and abundance of fishes and invertebrates in Gulf of Mexico estuaries. Volumen II Species life history summaries. ELMR Rep. No. 11. NOAA/NOS Strategic Enviromental Assessments Division, Silver Spring Maryland, USA. 377 pp.

Pedersen, B. & B.O. Eggum. 1983. Prediction of protein digestibility by an in Vitro enzymatic pH-STAT procedure. Journal of Animal Physiology. 49: 265-277.

Peña, E., C. Hernández, C.A. Álvarez-González, L. Ibarra-Castro, A. Puello-Cruz & R.W.

Hardy. 2015. Comparative characterization of protease activity in cultured spotted rose snapper juveniles (*Lutjanus guttatus*). Lat Am J Aquat Res. 43(4): 641-650.

Peña, E., C. Hernández, L. Ibarra-Castro, C.A. Álvarez-González. 2017. In vitro protein digestibility of different grow-out stages of spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*, Steindachner, 1869). Aquaculture Nutrition. 1-12.

Peña-Martínez, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte & J.L. Ortíz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Aquaculture. 219: 633-644.

Peres, H. & A. Oliva-Teles. 1999. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilisation by European sea bass juveniles *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture. 179: 325-334.

Pérez, J.J., G.A. Wicki, F.J. Moyano, F.J. Alarcón. 2003. Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*). Universidad de Zaragoza (eds.). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), Zaragoza, España, 1 septiembre-30 octubre, 2003. Pp. 442-453.

Planas, M. & I. Cunha. 1999. Larvae culture of marine fish: problems and perspectives. Aquaculture. 177: 171-190.

Pokniak, J.M.V., M.S Muñoz, I.A.M Díaz, N. González & C.M. Díaz. 2004. Efecto de dietas con diferentes proporciones de proteína y lípidos sobre la respuesta productiva y características del Salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*). Medicina Veterinaria. 36: 163-172.

Prieto, M., F. Castaño, J. Sierra, P. Logato & J. Botero. 2006. Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: copépodos y mesocosmos. Revista MVZ Córdoba. 11: 30-36.

Quintero, H.E., E. Durland, D.A. Davis & R. Dunham. 2009. Effect of lipid supplementation on reproductive performance of female channel catfish*, Ictalurus punctatus*, induced and strip-spawned for hybridization. Aquaculture Nutrition. 17: 117-129.

Rahim, A., G. Abbas, M. Naeem, S. Ferrando, L. Gallus, M. Hafeezur-Rehman, A. Ghaffar & A. Mateen. 2017. Effect of different dietary oils on growth, feed conversion and body composition of juvenile black fin Sea Bream, *Acanthopagrus berda* (Forsskal, 1775). Pakistan Journal Zool. 49(2): 655-661

Render, J.H. & C.A. Wilson. 1992. Reproductive biology of sheepshead in the northern Gulf of Mexico. Transactions of the American Fisheries Society. 121: 757-764.

Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu & M. T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture. 179: 465-473.

Rideout, R.M., G.A. Rose & M.P.M. Burton. 2005. Skipped spawning in female iteroparous fishes. Fish and Fisheries. 6: 50-72.

RIINIPA, 2012. Red Nacional de Información e Investigación en pesca y acuacultura, Región III Golfo de México Norte, Inapesca.gob.mx. (consultado 14 agosto de 2016).

Robaina, L., F.J Moyano, M.S Izquierdo, J. Socorro, J.M Vergara & D. Montero. 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream *Sparus aurata*: Nutritional and histological implications. Aquaculture.157: 347-359.

Robinson, E.H. & R.H. Robinette. 2010. Effects of dietary protein level and feeding regime on grow and on fattiness of channel catfish *Ictalurus punctatus.* Journal of Applied Acuaculture. 3(1-2): 67-90

Robyt, J.F. & W.J. Whelan. 1968. Starch and its Derivates. Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London, England.143 pp.

Rønnested, I., C.R. Rojas-García, S.K. Tonheim & L. El Conceição. 2001. In vivo studies of digestion and nutrients assimilation in marine fish larvae. Aquaculture. 201: 161-175.

Rosenlund, G., A. Obach, G.M Sandberg, H. Standal, & K. Tveit. 2001. Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult Res. 32: 323-328.

Ruey-Liang, C., S. Mao-Sen, & C. Houng-Yung. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture. 193: 81-89.

Sá, R., P. Pousáo-Ferreira, & A. Olive-Teles. 2008. Dietary protein requirement of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. Aquaculture Nutrition. 14: 309-317.

Sabaut, J.J. & P. Luquet. 1973. Nutritional requirement of the gilthead bream *Chysophrys aurata*. Quantitative protein requirements. Mar Biol. 18: 50-54.

Sáenz de Rodrigáñez, M., F.J. Alarcón, M.I. Martínez, F. Ruiz, M. Díaz, F.J. Moyano. 2005. Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Bol Inst Esp Oceanogr 21(1-4): 95-104.

Salvensen, G. & H. Nagase.1989. Inhibition of proteolytic enzymes. In: R. Beynon and J. S. Bond (Eds.). Proteolytic enzymes. IRL Press Oxford, UK. Pp 83-104.

Sang-Min, L., G.J. Im, & Y.L. Jong. 2002. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish *Sebastes schlegeli*. Aquaculture. 211: 227-239.

Schreck, C.B., W. Contreras-Sánchez & M.S. Fitzpatrick. 2001. Effects of stress on fish reproduction gamete quality and progeny. Aquaculture. 197: 3-24.

Schuchardt, D., J.M. Vergara, H. Fernández-Palacios, C.T. Kalinowski, C.M. Hernández-Cruz, M.S. Izquierdo & L. Robaina. 2008. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of the red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. Aquaculture Nutrition. 14: 1-9

Scocco, P., G. Menghi & P. Ceccarelli. 1997. Histochemical differentiation of glycoconjugantes occurring in the tilapia intestine. J Fish Biol. 51: 848-857

Sedberry, G. R. 1987. Feeding habits of sheepshead, *Archosargus probatocephalus*, in offshore reef habits of the southeastern continental shelf. Northeast Gulf Sci. 9: 29-37.

Seiffert, B. 2001. Effect of dietary (n-3) highly unsaturated fatty acids on growth and survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae during fish feeding. Brazilian Journal Medical Biological Research. 34: 645-651.

Seiliez, I., J.S Bruant, J.L Zambonino-Infante, S. Kaushik, & P. Bergot. 2006. Effect of dietary phospholipid level on the development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae fed a compound diet. Aquaculture Nutrition. 12: 372-378.

Serrano, J.A., G.R Nenematipour & D.M. Gatlin III. 1992. Dietary protein requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus* and relative use of dietary carbohydrate and lipid. Aquaculture. 101: 283-291.

Shymaa, M., Shalaby, Y. Ashraf, El-Dakar, M. Olfat, Wahby, P. Imad & Saoud. 2011. Growth, feed utilization and body composition of white sea bream *Diplodus sargus* juveniles, offered diets with various protein and energy levels. Mar. Sci. 22(2): 3-17.

Siddiqui, A.Q., S.M Howlander & A.A. Adam. 1998. Effects of dietary protein levels on growth, feed conversion and protein utilization in fry and young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 70(1-2): 63-73.

Silva, P., C.P. Andrade, V.F.A. Timoteo, E. Rocha, &. M.P.L. Valente. 2006. Dietary protein, growth, nutrient utilization and body composition of juvenile blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich) Aquaculture Research. 37: 1007-1014

Silverstein, J.K., W. Shearer, E. Dickhoff & Plisetskaya. 1999. Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. Aquaculture. 177: 161-169.

Simpson, B.K. 2000. Digestive Proteases from Marine Animals. In: Haard, N.F., Simpson, B.K. (Eds.), Seafood Enzymes. Marcel Dekker, New York, USA. Pp 191-213.

Springer, V.G. & K. D. Woodburn. 1960. An ecological study of the fishes of the Tampa Bay

area. Florida Board of Conservation and Marine Laboratory Professional Papers Series 1. St. Petersburg, Florida, USA. Pp. 64-68.

Srivastava, A.S., T. Kurokawa & T. Suzuki. 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Comp Biochem Physiol. l32A: 629-635.

Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI. Cincinnati, OH, USA. 317 pp.

Sunde, J. 2006. Digestive protease activities, growth and feed utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dr. Scient Tesis. University of Bergen, Norway. 96 pp.

Tacon, A.G.J. 1993. Feed ingredients for warmwater fish: Fish meal and other processed feed stuffs. FAO. Fisheries Circular 845. 64 pp.

Tacon, A.G.J. 1995. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. J Appl Ichthyol. 11: 205-214.

Tanji, M., E. Yakabe, T. Kageyama, Y. Shin-ichi, M. Ichinose, K. Miki, H. Ito & K. Takahashi. 2007. Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. Comp Biochem Physiol. B146: 412-420.

Teng, S.K., T.E Chua & P.E. Lim. 1978. Preliminary observation on dietary protein requirement of estuary grouper *Epinephelus salmoides* Maxwell cultured in floating net cages. Aquaculture. 15: 257-271.

Thorsen, A., E.A. Trippel & Y. Lambert. 2003. Experimental methods to monitor the production and quality of eggs of captive marine fish. J Northwest Atlantic Fish Sci. 33: 55-70.

Tibaldi, E., P. Beraldo, L.A Volpelli & M. Pinosa. 1996. Growth response of juvenile dentex *Dentex dentex* L. to varying protein level and protein to lipid ratio in practical diets.

Aquaculture. 139: 91-99.

Tibbets, S.M., J.A.J. Verret & S.P. Lall. 2011. In vitro pH stat protein hydrolisis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua* 2. In vitro protein digestibility of common and alternative feed ingrediets. Aquaculture. 319: 407-416.

Toledo-Solís, F.J., G. Márquez-Couturier, A. Uscanga-Martíınez, R. Guerrero-Zárate, N. Perales-García, W.M. Contreras, S. Camarillo-Coop & C.A. Álvarez-González. 2015. Partial charaterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günter, 1867). Aquaculture nutrition. 1(1): 1-10.

Tramati C., B. Savona & A. Mazzola. 2005. A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) (Osteichthyes, Sparidae): evidence for the definition of nutritional protocols. Aquaculture International. 13: 89-95.

Treviño, L., C.A. Álvarez-González, N. Perales-García, L. Arévalo-Galán, A. Uscanga-Martínez, G. Márquez-Couturier, I. Fernández & E. Gisbert. 2010. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther (1862), from hatching to the juvenile stage. J Appl Ichthiol. 27: 73-82.

Trippel, E.A. 1998. Egg size and viability and seasonal offspring production of young Atlantic cod. Transactions of the American Fisheries Society. 127: 339-359.

Tucker, J.W. Jr. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, USA. 750 pp.

Tucker, J.W. Jr. 2004. Sheepshead, a potential American sea bream for farming. World Aquaculture Magazine. 35: 48-68.

Tucker, J.W. Jr. & S.R. Alshuth. 1997. Development of laboratory-reared sheepshead, *Archosargus probatocephalus* (Pisces: Sparidae). Fishery Bulletin. 95: 394-401.

Tucker, J.W. Jr. & P.A. Barbera. 1987. Laboratory of spawning of shepshaed. The Progresive Fish-Culturist. 49(3): 229-230.

Uscanga, A., F.J. Moyano & C.A. Álvarez-González. 2010. Assessment of enzymatic

efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish Physiol Biochem. 36:1079-1085.

Utne-Palm, A.C. 1997. The effect of turbidity and illumination on the reaction distance and research time on the marine planktivore *Gobiusculus flavescens* to its planktonic prey. J Fish Biology. 50: 926- 938.

Valente, L.M.P., F., Linares, J.L.R. Villanueva, J.M.G Silva., M. Espe, C. Escórcio, M.A. Pires, M.J Saavedra, P. Borges, F. Medale, B. Álvarez-Blázquez, & J.B. Peleteiro. 2011. Dietary protein source or energy levels have major impact on growth performance, nutrient utilization or flesh fatty acids composition of market-sized *Senegalese sole*. Aquaculture. 318: 128-137.

Vega-Villasante, F., O. Carrillo-Farnés, B. Jaime- Ceballos & J. Galindo-López. 2008. Alimentos funcionales en la nutrición de organismos acuáticos: del pasado reciente al futuro inmediato. Industria Acuícola. 4: 36-38.

Vendrell, J., E. Querol & F.X. Avilés. 2000. Metallocarboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. Biochim Biophys Acta. 1477: 284-298

Versaw, W., S.L. Cuppett, D.D. Winters, L.E. Williams. 1989. Animproved colorimetric assay for bacterial lipase in non fat dry milk. J Food Sci. 54: 232-254

Walford, J. & T.J. Lam. 1993. Development of the digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture. 109: 187-205

Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) Methods of enzymatic analysis, vol V. Verlag Chemie, Weinham, Massachusetts, USA. Pp. 270-277.

Wang, J.T., Y.J. Liu, L.X. Tian, K.S Mai, Z.Y. Du, Y. Wang, & H.J. Yang. 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile

cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture. 249: 439-447.

Wang, L., Q. Lu, S. Luo, W. Zhan, R. Chen & B. Lou. 2016. Effect ofdietary lipid on growth performance, body composition plasma biochemical parameters and liver fatty acids content of juvenile yellow drum *Nibea albiflora.* Aquaculture Reports. 4: 10-16.

Wang, N., R.S. Hayward & D.B. Noltie. 2000. Effects of social interaction on growth of juvenile hybrid sunfish held at two densities. North American Journal of Aquaculture. 62: 161-167.

Wang, H., Y. Wang, Q. Wang, C. Xue & M. Sun. 2006. Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Physiol Biochem. 32: 179–188

Watanabe, T. 1995. Importance of the study of broodstock nutrition four further development of aquaculture. In: Nutrition and feeding in fish. Cowey CB, Marki AM, Bell JB (eds). Academic Press. London, England. Pp. 395-414.

Watanabe, T. & R. Vassello-Agius. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. Aquaculture. 227: 35-61.

Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish Cortus nozawae. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 50: 409-416.

Weber, K. & M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Biological Chemistry. 244: 4406-4412.

Weller, V.D. 2006. Advances in the culture of fat snook *Centropomus parallelus* with isocaloric diets and two types of oild souces vegetal and animal. Aquaculture. 32: 45-56.

Wenner, C. 2004. Status and trends in the fishery and population of sheepshead in South Carolina waters. Technical Report to the South Carolina Department of Natural Resources. Marine Resources Division Publications. South Carolina, USA. 64 pp.

Whitaker, J.R.1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2da Edición Marcel Dekker, INC, New York, USA. 789 pp.

Yang, S.D., C. Liou & F. Liu. 2002. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus*. Aquaculture. 213: 363-372.

Yasumaru, F. & D. Lemos. 2014. Species specific in vitro protein digestión (pH- stat) for fish: Method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 426: 74-84.

Yoshinaka, R., M. Sato, H. Tanaka & S. Ikeda. 1985. Some enzymatic properties and digestive function of a pancreatic metalloproteinase in the catfish (*Parasilurus asotus*). Comp Biochem Physiol. 80B (2): 223-226.

Yúfera, M. & M.J. Darias. 2007. Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture. 267: 94-99.

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

Zavala-Leal, I., S Dumas, E.O. López-Villegas, E. Peña, M. Contreras-Olguín, L. Flores-Montijo & J. De la Cruz-Aguero. 2013. Structural development of Pacific red snapper *Lutjanus peru* from hatching to the onset of first feeding. Aquaculture Research. 45: 519-527.

Zhou, Q., L. Guang-Ming, H. Yuan-Yuan, L. Weng, K. Hara, S. Wen-Jin & C. Min-Jie. 2008. Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). J Agric Food Chem. 56: 5401-5406.

Zhung, D.L. 2006. Farming and nutrition of fat snook *Centropomus parallelus* and evaluation of diets containing three levels of dietary protein. Aquaculture. 267: 134-144.