

DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE INGREDIENTES PROTEÍNICOS EN LA MOJARRA CASTARRICA *Cichlasoma urophthalmus*

In vitro PH-STAT DIGESTIBILITY OF PROTEIN INGREDIENTS IN THE MAYAN CICHLID *Cichlasoma urophthalmus*

Carlos Alberto Cuenca Soria, Carlos Alfonso Álvarez González ✉, José Luis Ortiz-Galindo, Rocío Guerrero-Zárate, Martha Alicia Perera-García, Raúl Enrique Hernández-Gómez, Héctor Nolasco-Soria

(CACS, JLOG) Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 592, La Paz, BCS, 23096, México.

(CAÁG, RGZ, MAPG, REHG) Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 86139, México. alvarez_alfonso@hotmail.com

(HNS) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Mar Bermejo No 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 128, La Paz, BCS, 23090, México.

Artículo recibido: 17 de agosto de 2013, **aceptado:** 28 de noviembre de 2013

RESUMEN. El cultivo de *Cichlasoma urophthalmus* ha observado un lento desarrollo, ya que actualmente no dispone de un alimento balanceado que contenga los ingredientes apropiados para su crecimiento. En este estudio se determinó el grado de hidrólisis (GH, %) de 29 ingredientes proteínicos animales y vegetales, mediante el sistema pH STAT, además de calcular la liberación de aminoácidos totales (ALT, $\mu\text{g ml}^{-1}$), utilizando extractos multienzimáticos de estómago e intestino de juveniles de *C. urophthalmus*. De todos los ingredientes probados, los valores GH ácido / alcalino óptimos fueron los de la carne y vísceras de pollo ($9.6 \pm 1.8 / 22.7 \pm 4.3$), carne de cerdo ($22.0 \pm 0.52 / 31.6 \pm 2.2$) y pasta de coco ($10.4 \pm 1.5 / 21.6 \pm 5.2$), siendo significativamente mayores ($p < 0.05$) con respecto a los GH ácido/alcalino de ingredientes de referencia, hemoglobina/caseína ($6.9 \pm 1.8 / 2.2 \pm 0.5$). Paralelamente, los valores ALT ácido/alcalino de estos mismos ingredientes fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$) ($793.9 \pm 21.1/1587.8 \pm 13.0$, $310.5 \pm 33.0/1013.2 \pm 20.3$, $591.9 \pm 4.1 / 574.6 \pm 11.9$ respectivamente) a los de los ingredientes ácido / alcalino de referencia (hemoglobina 1293.1 ± 24.1 y caseína 943.3 ± 14.7). Se concluye que los ingredientes de prueba mencionados pueden ser fuentes potenciales de proteína, como base de una fórmula estándar en el cultivo de *C. urophthalmus*.

Palabras clave: Acuicultura, cíclido nativo, harinas, nutrición.

ABSTRACT. The commercial culture of *Cichlasoma urophthalmus* has not been developed, because there is not any commercial balanced food available with the ingredients required for the species. This study determined the degree of hydrolysis (GH, %) of 29 animal and plant protein ingredients using the pH STAT system, and calculated the total free amino acid content (ALT, $\mu\text{g ml}^{-1}$) using multienzymatic extracts obtained from the stomach and intestine of *C. urophthalmus* juveniles. Of all the tested ingredients, the optimum acid/alkaline GH values were those of the poultry-by products and meat ($9.6 \pm 1.8 / 22.7 \pm 4.3$), pork meal ($22.0 \pm 0.52/31.6 \pm 2.2$) and coconut paste ($10.4 \pm 1.5/21.6 \pm 5.2$), and they were significantly greater ($p < 0.05$) than the acid/alkaline GH values of the reference ingredients hemoglobin/casein ($6.9 \pm 1.8 / 2.2 \pm 0.5$). Concurrently, the acid/alkaline ALT values for these same ingredients were statistically equal ($p > 0.05$) ($793.9 \pm 21.1/1587.8 \pm 13.0$, $310.5 \pm 33.0/1013.2 \pm 20.3$, $591.9 \pm 4.1/574.6 \pm 11.9$ respectively) to those of the acid/alkaline reference ingredients (hemoglobin 1293.1 ± 24.1 and casein 943.3 ± 14.7). It is concluded that the test ingredients may constitute strong sources of proteins, as the base of a standard formula for *C. urophthalmus* culture.

Key words: Aquaculture, native cichlid, meal, nutrition.

INTRODUCCIÓN

La alta mortandad durante el cultivo de peces se debe en parte al desconocimiento de la capaci-

dad digestiva de los organismos para hidrolizar los diversos nutrientes presentes en la dieta. En este contexto, las proteínas son el principal determinante del peso vivo (biomasa) ganado por los peces

(Dumas *et al.* 2007), cuyo contenido de aminoácidos esenciales juega un papel importante como combustible metabólico en los peces (Kaushik & Seiliez 2010). Recientemente, se han desarrollado diferentes métodos para determinar la digestibilidad de la proteína en diversos ingredientes, utilizando varias técnicas, como es la digestibilidad aparente (*in vivo*), con marcadores como la zeolita y el óxido crómico; las cuales resultan complicadas y costosas debido al lento crecimiento de los peces, la dificultad de recolectar las heces en el medio acuático y la influencia de los niveles de inclusión de los nutrientes y el aprovechamiento de algunos combustibles (March *et al.* 1985; Shiau & Liang 1995). Actualmente, se realizan estudios de digestibilidad *in vitro*, utilizando el sistema pH STAT, donde se evalúa el grado de ruptura (porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados) de los enlaces peptídicos por acción de las diferentes proteasas (Alarcón *et al.* 2002). A este respecto, Ezquerro *et al.* (1997) y Nolasco *et al.* (2006) estudiaron la digestibilidad *in vitro* de proteínas en camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Asimismo, Álvarez-González (2003) probó harinas de langostilla, sardina, sangre de res e hidrolizado de pescado como fuentes proteínicas en juveniles de cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*, para medir su digestibilidad *in vitro*, con fines de diseño de dietas inertes, siendo la harina de sangre de res la que obtuvo el mejor grado de hidrólisis (GH). Fenerci & Sener (2005) exploraron la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de cuatro alimentos comerciales, en función de sus procesos de fabricación, para trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, resultando con mayor GH los alimentos extruidos, que los presurizados. Frías-Quintana *et al.* (2010) exploraron la digestibilidad *in vitro* de ingredientes proteínicos animales y vegetales con extractos multienzimáticos de *Atractosteus tropicus*, con fines de diseño de dietas de larvicultivo de la especie mencionada. A pesar de los estudios anteriores, existe un marcado vacío de información, respecto a la digestibilidad de ingredientes considerando la fisiología digestiva de la especie con el fin de considerárseles en la formulación de una dieta que sea acorde con la capacidad digestiva. En este aspecto, se han realizado diversos

estudios con miras a su cultivo como los relacionados al requerimiento de proteína de *C. urophthalmus* los cuales fueron estudiados por Martínez-Palacios *et al.* (2006); así mismo, se han determinado los cambios de la actividad de enzimas digestivas y el desarrollo del sistema digestivo durante la ontogenia inicial, mediante la caracterización de proteasas digestivas en juveniles (López-Ramírez *et al.* 2011; Cuenca *et al.* 2013a, b). El objeto de la presente investigación fue evaluar la digestibilidad *in vitro* de un grupo de ingredientes de origen animal y vegetal, con fines de diseño de alimentos inertes para la etapa juvenil de *C. urophthalmus*. Se pretende que los alimentos formulados con base a la capacidad digestiva de esta especie nativa, contribuya a sentar las bases para su cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reproducción, larvicultivo y obtención de juveniles

Para este estudio los juveniles de *C. urophthalmus* (5.73 ± 1.43 g peso húmedo, $n = 53$) fueron obtenidos a partir del larvicultivo de un total de 4 500 larvas que se colectaron por medio de sifonéo de los tanques circulares de reproducción (2 000 L) dentro de las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL-UJAT) en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México. Las larvas fueron alimentadas por un periodo de 15 días utilizando nauplio de *Artemia* y otros 15 días con alimento balanceado para trucha (Silver Cup, 45 % de proteína y 16 % de lípidos), suplementado con la hormona 17α metiltestosterona ($60 \text{ mg L de agua marina}^{-1}$ o $\text{kg de alimento}^{-1}$ respectivamente) para obtener una población monosexo. Terminado este periodo, los juveniles fueron mantenidos en un sistema de recirculación de agua en tanques de 1.7 m^3 durante un periodo de dos semanas adicionales antes de su procesamiento. Los parámetros de la calidad del agua fueron medidos diariamente, se mantuvieron en $28.3 \pm 0.8^\circ\text{C}$ de temperatura, $5.89 \pm 0.48 \text{ mg L}^{-1}$ de oxígeno disuelto (YSI 55, California, USA) y 7.35 ± 0.11 de pH (Denver Instrument UB-10, Denver, Colorado,

USA) durante el confinamiento de juveniles.

Obtención de extractos multienzimáticos

La totalidad de los juveniles de *C. urophthalmus* fueron disectados en frío, a fin de aislar estómagos e intestinos de la masa visceral, para lo cual se obtuvo el peso húmedo por individuo y de cada órgano con una balanza analítica (Denver Instrument APX-200, resolución 0.1 mg). Los tejidos fueron homogenizados en un macerador eléctrico (Ultra Turrax® Ika T18 Basic), a razón de 1:5 (tejido/agua destilada, p/v). Las mezclas fueron centrifugadas a 14 000 rpm y 4 °C por 30 min en una centrífuga (Eppendorf 5810-R, con rotor F45-3011). Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis posterior.

Materias primas

Las materias primas y sus respectivos contenidos de proteína y humedad se muestran en la Tabla 1. Las harinas de grano de maíz, maíz amarillo, trigo, sorgo, carne de pollo y pasta de soya fueron obtenidas de la empresa GALMEX S.A. en Villahermosa, Tabasco, México. Las harinas de carne de res, sangre porcina, carne de cerdo, soya, gluten de maíz, pulido de arroz, plasma porcino, salvado de trigo, sangre de res y pasta de canola fueron obtenidas de la planta de alimentos Consorcio Súper en Guadalajara, Jalisco, México. La harina de pescado y el hidrolizado de pescado fueron obtenidos de Alimentos Pedregal S.A. de C.V. y CCP Noruega, respectivamente; la harina de carne de cerdo y de pollo se obtuvieron del National Renderers Association; mientras que las harinas de pescado marca Aqua; jaiba, camarón, calamar, carne y sangre de res se obtuvieron de Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México; el gluten de trigo de Glútenes de México S.A. de C.V. Estado de México, México; la pasta de coco fue obtenida de la Unión de Copreros de Tabasco S.A. de C.V. en Villahermosa, Tabasco, México; y la harina de canavalia fue obtenida de un productor privado en Teapa, Tabasco, México. La sangre de res se obtuvo del rastro de Texcoco, Estado de México, México.

Determinación de la actividad específica de enzimas estomacales e intestinales

Con el fin de conocer la cantidad de unidades de enzimas en extracto de estómago, se hizo uso del método de Anson (1938), con las modificaciones que siguen. Se formó la mezcla de reacción con 1 ml de hemoglobina (al 1 % en tampón glicina-HCl 100 mM, pH 2) y 20 μ l de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min. La reacción se detuvo con 500 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y se dejó en reposo a 4 °C por 15 min. Las muestras por triplicado fueron centrifugadas a 12 000 rpm (Eppendorf 5810-R, con rotor F45-3011). Los sobrenadantes fueron recuperados y diluidos con agua destilada (1:10) para la lectura de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Visible), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ g de equivalentes de tirosina por minuto.

Para determinar la actividad de extracto multienzimático de intestino, se utilizó el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984). Se utilizó 1 ml de caseína de Hammarstein (ICN Biomedicals No. 101289, Aurora OH USA) al 1 % en solución tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.5) como sustrato de 5 μ l de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*. La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min. La reacción fue terminada con 500 μ l de TCA al 20 %. Para el centrifugado (Eppendorf 5810-R, con rotor F45-3011, 25 °C por 10 min) y lectura de absorbancias de muestras a 280 nm, para de igual manera obtener la cantidad de equivalentes de tirosina liberada por reacción hidrolítica. Para los métodos de actividad proteolítica ácida y alcalina, se utilizó un ensayo testigo, donde se añadió el extracto multienzimático, hasta después de parar la reacción con TCA al 20 %. Ambos valores de actividad específica se tomaron como base para el cálculo del volumen de extractos multienzimáticos, tanto para la hidrólisis ácida como alcalina, de ingredientes proteínicos.

Tabla 1. Contenido de proteína (%), lípidos (%) y de humedad (%) de los ingredientes utilizados comúnmente en la fabricación de alimentos para acuicultura.

Table 1. Content of protein (%), lipids (%) and humidity (%) in the ingredients commonly used in the preparation of feeds for aquaculture.

Ingrediente	Contenido de proteína (%)	Contenido de humedad (%)	Contenido de lípidos (%)
Harina de camarón	28.0	5.0	2.0
Harina de jaiba	30.0	4.9	1.0
Harina de carne de cerdo	15.5	6.9	13.5
Harina de pollo	58.4	6.1	13.5
Harina de sangre de res (Prieto)	72.0	4.4	< 1.0
Harina de carne de res (rastró)	46.5	7.4	< 1.0
Pasta de coco	18.0	0.8	ND
Harina de pescado (Acua)	56.0	3.4	12.0
Harina de carne y vísceras de pollo	60.0	5.12	13
Harina de sangre de res	64.0	4.8	< 1.0
Harina de pescado	64.1	4.8	15.0
Harina de pollo	65.0	4.5	13.5
Harina de maíz amarillo	8.8	13.6	ND
Harina de grano de maíz	9.8	11.2	ND
Pasta de soya	49.2	6.0	ND
Harina de calamar	75.0	5.0	7
Harina de trigo	12.4	12.8	ND
Harina de canola	37.0	14	ND
Hidrolizado de pescado	72.0	8.0	8.0
Salvado de trigo	14.8	11.8	ND
Harina de sangre de cerdo	80.0	10.0	ND
Harina de sangre de res (Texcoco)	64.0	5.0	ND
Pulido de arroz	12.8	10.9	ND
Harina de soya	46.8	11.6	0.5
Harina de canavalia	30.0	8.5	ND
Harina de sorgo	8.9	14.0	ND
Gluten de trigo	75.0	10.0	1.0
Hemoglobina	90.0	2.0	< 1.0
Caseína	90.0	2.0	1.2
Harina de plasma porcino	78.0	9.0	ND
Gluten de maíz	61.5	9.4	ND

Determinación de proteína soluble

Para el cálculo de concentración de proteína en extractos, se utilizó el método de Bradford (1976), con una curva estándar de albúmina bovina. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Digestibilidad *in vitro* ácida y alcalina en el pH Stat

Un total de 29 ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal (Tabla 1) fueron puestos a hidrolizar en un sistema pH Stat Titrino (Metrohm 718, Suiza), de acuerdo con Saunders *et al.* (1972), modificado por Dimes & Haard (1994), para eva-

luar su grado de hidrólisis (GH, %). Los ensayos de digestión ácida se realizaron en un volumen final de 5 ml de la mezcla de reacción. Cada ingrediente de prueba se resuspendió en agua destilada a una concentración de 8 mg de proteína ml⁻¹ ajustando el pH a 2 con HCl 1 N. La digestión se inició con 10 µL de proteasa de extracto multienzimático de estómago de mojarra castarrica *C. urophthalmus* en fase juvenil (conteniendo 30 U ml⁻¹ de proteasa ácida). Se utilizó a la hemoglobina como ingrediente de referencia. Para el caso de la digestión alcalina, los ensayos se realizaron en un volumen final de 5 ml de la mezcla de la reacción. Cada ingrediente

de prueba se solubilizó en agua destilada a razón de 8 mg de proteína ml^{-1} ajustando el pH a 7.5 con NaOH 1 N. La reacción se inició con 110 μl de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus* en fase juvenil (conteniendo 120 U ml^{-1} de proteasa alcalina) y caseína Hammarstein como ingrediente de referencia.

Al inicio y término de 900 y 2 700 s de digestión ácida y alcalina de ingredientes proteínicos se tomaron muestras de mezcla hidrolizada respectivamente. La unidad de tiempo previa a la adición de extracto multienzimático, fue definida como el tiempo cero. Las muestras fueron conservadas a -20°C , para la determinación posterior de aminoácidos libres totales. A partir del gasto de HCl (Fase ácida) y de NaOH (Fase alcalina) se determinó el grado de hidrólisis (GH), el cual se expresa como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (htot). Donde el valor de $(h) = [\text{consumo de base en ml (Vb)}] \times [\text{normalidad de la base (Nb)}] \times [1 \times (\text{constante de disociación de los grupos } \alpha\text{-NH}_2 \text{ y } \alpha\text{-COOH respectivamente})^{-1}] \times [1 \times (\text{masa de proteína en la mezcla de reacción})^{-1}]$. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de aminoácidos libres totales (ALT) en condiciones ácidas y alcalinas

Las muestras parcial y totalmente hidrolizadas fueron puestas a reaccionar con reactivo o-phtaldialdehído (OPA), de acuerdo con Church *et al.* (1983), que consiste en la unión de los grupos amino de los aminoácidos con el OPA. Para realizar lo anterior, 20 μl de mezcla hidrolizada fueron fijados con TCA al 12 % para los ensayos con reacción química con OPA (80 mg de OPA en 1 ml de metanol, 0.2 ml de β -mercaptoetanol, 50 ml de tetraborato de sodio al 0.1 M y 5 ml de SDS al 20 %, y disueltos en 100 ml de solución con agua destilada). Se obtuvo lectura de la absorbancia a 340 nm. La ALT de la mezcla de reacción en $\mu\text{g ml}^{-1}$ se evaluó según una curva patrón con l-leucina (0.5 mg ml^{-1}) con concentraciones crecientes de 0 a 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

Tabla 2. Actividad de enzimas proteolíticas del estómago (proteasas ácidas) e intestino (proteasas alcalinas) de mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*.

Table 2. Stomach (acid proteases) and intestine (alkaline proteases) proteolytic enzyme activity in the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*.

	Proteasas ácidas	Proteasas alcalinas
U ml^{-1}	2.7 \pm 0.7	10.6 \pm 1.9
U mg proteína $^{-1}$	1.8 \pm 0.5	3.1 \pm 0.5
U g tejido $^{-1}$	13.6 \pm 3.6	53.2 \pm 9.4

Análisis estadístico

Los datos que cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (GH y ALT alcalinos), fueron analizados con pruebas ANOVA paramétricas de una vía y de Duncan, para establecer diferencias significativas entre grupos de prueba y de referencia. Por otro lado, con la finalidad de aproximar su distribución a la normalidad y reducir la heterogeneidad de varianzas entre grupos, los valores GH ácidos fueron sometidos a la transformación $X' = [\text{raíz cuadrada } (X + 1) + 0.375] / [\text{raíz cuadrada } (X) + 15]$, donde X' es el valor GH-ésimo transformado y X es el valor GH-ésimo en crudo. Para los valores ALT ácidos que no cumplieron los supuestos básicos (aún con transformaciones), las diferencias significativas se establecieron con una prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre los tratamientos fueron detectadas con la prueba a *posteriori* de Nemenyi (Zar 2010). Para el cómputo de todas las pruebas estadísticas se empleó el programa StatisticaTM v8, usando un valor de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Actividad específica de extractos multienzimáticos de estómago e intestino

En la Tabla 2 se muestran los resultados de actividad específica de proteasas de extractos multienzimáticos de estómago e intestino de juveniles del cíclido maya *C. urophthalmus*. Las proteasas ácidas mostraron un valor de actividad específica de 2.7 ± 0.5 U mg proteína $^{-1}$ y las proteasas alcalinas alcan-

zaron un valor de 10.6 ± 0.5 U mg proteína⁻¹; predominando las proteasas intestinales, con relación a las proteasas estomacales. Ambos valores de actividad específica se tomaron como base para el cálculo del volumen de extractos multienzimáticos, tanto en la hidrólisis de ingredientes proteínicos ácida, como alcalina.

Digestibilidad *in vitro* ácida de ingredientes proteínicos

Los grados de hidrólisis ácida de los 29 ingredientes proteínicos de prueba y de hemoglobina, ingrediente de referencia, se pueden apreciar en la Tabla 3. La hemoglobina mostró un GH de 2.2 ± 0.5 . El mayor GH encontrado fue el de la harina de camarón, con un valor de 30.9 ± 9.7 . Es posible visualizar que la mayoría de ingredientes proteínicos de prueba observan un GH mayor al de la hemoglobina, salvo las harinas de plasma porcino y gluten de maíz cuyos GH son 2.1 ± 0.5 y 0.6 ± 0.3 , de manera respectiva, siendo éste último el menor GH encontrado de todos los ingredientes de prueba. Se encontraron diferencias significativas entre casi todos los ingredientes de prueba, con relación al de referencia ($p < 0.05$), excepto con pulido de arroz, harina de soya, harina de canavalia, harina de sorgo, gluten de trigo, harina de plasma porcino y gluten de maíz ($p > 0.05$). Todos GH de los ingredientes de prueba que resultaron ser significativos, se encontraron por arriba del GH del ingrediente de prueba.

Digestibilidad *in vitro* alcalina de ingredientes proteínicos

En la Tabla 4 se indican los valores GH para los 29 ingredientes proteínicos y el de referencia (caseína Hammersten). La caseína observó un GH de 6.9 ± 1.8 . El GH de la harina de carne de cerdo resultó ser el más alto, con 31.6 ± 2.2 ; mientras que el GH de la harina de jaiba fue la más baja, con 2.2 ± 0.7 . Por otro lado, se hallaron diferencias significativas entre la caseína y los ingredientes de prueba: harinas de carne de cerdo, de sangre de res (Texcoco), de carne y vísceras de pollo, de pollo Nacional, de pasta de coco, de pescado (Pedregal), de pescado (Acua), de sangre de res, de sangre de

res (Prieto), de carne de res, de pescado, de soya y de canola ($p < 0.5$); cuyos valores GH se situaron por arriba del GH ingrediente de prueba.

Determinación de la ALT en condiciones ácidas

La Tabla 5 muestra los valores ALT ácidas de los 29 ingredientes de prueba y su referente, la hemoglobina. De ésta última, se obtuvo un valor ALT de 1293.1 ± 24.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, valor que se situó por encima de todos los ingredientes de prueba. El valor ALT que le siguió fue el correspondiente a harina de sangre de cerdo, con 1018 ± 53.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El valor ALT menor obtenido fue para la harina de sangre de res (Prieto), con 204.4 ± 2.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los valores ALT que fueron significativos, con relación al ingrediente de prueba, fueron el gluten de trigo y la harina de sangre de res (Prieto) ($p > 0.05$).

Determinación de la ALT en condiciones alcalinas

En la Tabla 6 es posible observar los valores ALT alcalinas de los 29 ingredientes de prueba y la caseína Hammarsten, empleada como referente, la cual mostró un valor ALT de 943.3 ± 14.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El valor ALT mayor fue el de la harina de carne y vísceras de pollo, con 1587.8 ± 13.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que el ALT menor correspondió al gluten de trigo, con 449.6 ± 8.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las diferencias significativas fueron evidentes entre el ingrediente de referencia con respecto a los de prueba: harina de carne y vísceras de pollo, harina de trigo, harina de camarón, harina de jaiba, harina de pescado (Pedregal), pulido de arroz, hidrolizado de pescado, harina de sangre porcina, harina de carne de cerdo, harina de pollo, harina de canola y harina de sorgo ($p > 0.05$). Tales ingredientes observaron valores ALT por encima del de referencia.

DISCUSIÓN

Los métodos de digestibilidad *in vitro* para evaluar GH en peces marinos y más recientemente en peces dulceacuícolas, permiten complementar técnicas convencionales de digestibilidad *in vivo*, por lo que cobran importancia capital cada vez mayor

en el estudio de la capacidad digestiva de los peces cultivados. Los métodos *in vitro* para evaluar digestibilidad de proteínas son necesarios, debido a que suelen ser más rápidos y baratos que los métodos *in vivo*, y permiten una evaluación más precisa del porcentaje de enlaces peptídicos totales hidrolizados de fuentes de proteína, utilizando cantidades mínimas de materiales crudos (Grabner 1985). En condiciones ácidas los ingredientes proteínicos de prueba de origen animal, como la harina de camarón, de jaiba, de carne de cerdo, de carne de res, de sangre de res, de carne y vísceras de pollo y de pescado (Acua), observaron valores GH muy por arriba del ingrediente de referencia (hemoglobina), en presencia de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. No obstante que la especie objeto de estudio es un pez omnívoro, en otros trabajos se ha observado que estos ingredientes resultaron tener valores GH significativamente mayores que la hemoglobina en presencia de extractos estomacales de pejelagarto *A. tropicus* (Frías-Quintana et al. 2010), el cual es pez de agua dulce del sureste de México. En este aspecto, la fisiología digestiva de *C. urophthalmus* en el estudio de caracterización de proteasas indica que la actividad de proteasas ácidas está presente, lo que demuestra que es un pez con alta capacidad de hidrolizar ingredientes en el estómago (Cuenca et al. 2013a). Sobresale el hecho de que entre estos ingredientes de prueba, figuren subproductos de la industria avícola y ganadera del Sureste de México (sangre de res y vísceras de pollo), que frecuentemente son eliminados en cuerpos de agua de la región, lo que los hace meritorios de más estudios. Son notorios también los valores GH de ingredientes proteínicos de origen vegetal, como la harina de maíz amarillo y la pasta de coco, obtenidos en condiciones ácidas. Está documentado el empleo de harina de maíz en el diseño de dietas artificiales de otras especies omnívoras, como el pacú *Piaractus mesopotamicus*, el pejerrey *Odontesthes bonariensis* y el pez rohu *Labeo rohita*; aunque su inclusión a altos niveles en la dieta, puede llevar a una sobreacumulación de glicógeno en hígado (Pérez et al. 2003; Debnath et al. 2007), por lo que es necesario elaborar más estudios acerca de la harina de maíz, y más tratándose de un in-

sumo abundante y de menor costo, con respecto de las fuentes de proteína animal.

En lo que concierne a los GH de ingredientes proteínicos de prueba en condiciones alcalinas, sobresalieron las harinas de carne de cerdo, de sangre de res (Texcoco), de carne y vísceras de pollo, de sangre de res (Prieto), de pollo (Nacional), de pescado (Purina), de pescado (Acua), de carne de res, y el hidrolizado de pescado, para el caso de los ingredientes de origen animal que fueron significativamente mayores al ingrediente de referencia (caseína). Sin embargo, Frías-Quintana et al. (2010) obtuvieron valores GH más ínfimos en estos ingredientes, salvo para la harina de carne y vísceras de pollo, en presencia de extractos de estómago e intestino de *A. tropicus*. Es posible que esto pueda ser explicado por las divergencias de hábitos alimenticios en una y otra especie, y por consiguiente su maquinaria enzimática durante la hidrólisis alcalina desde larva e incrementando su actividad para la etapa juvenil, lo cual fue corroborado hisológica y bioquímicamente (López-Ramírez et al. 2011; Cuenca et al. 2013b). A este respecto, precisamente Frías-Quintana et al. (2010) revelaron que gran parte de la digestión de ingredientes proteínicos en *A. tropicus*, se lleva a cabo en el estómago (y no en intestino). En cuanto a los ingredientes proteínicos de origen vegetal, las harinas de soya, de canola y pasta de coco, observaron los GH más acentuados. La harina de soya junto con la harina de carne y vísceras de pollo y las harinas e hidrolizados de pescado han mostrado aceptables valores GH en condiciones alcalinas en la dorada *Sparus aurata*, el pez disco *Symphysodon aequifasciatus*, la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*, y el róbalo blanco *Centropomus undecimalis* (Alarcón et al. 2002; Chong et al. 2002; Álvarez-González 2003; Concha-Frías 2007), aunque habría que tomar en consideración que se trata de especies marinas y más de hábitos carnívoros, lo que puede implicar ciertas diferencias en la composición enzimática de los extractos crudos intestinales, respecto de la de *C. urophthalmus*. La harina de soya es un ingrediente ampliamente utilizado en dietas artificiales para peces tanto marinos como dulceacuico-

Table 3. Valores finales de los grados de hidrólisis (GH) fase ácida y digestibilidad relativa (%) de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (hemoglobina).

Table 3. Final values of the degrees of hydrolysis (GH) of the acid stage and relative digestibility (%) of the test protein ingredients and reference ingredient (hemoglobin).

Ingrediente	GH (%)	Digestibilidad relativa (%)
Harina de camarón	30.9 ± 9.7*	1404.5
Harina de jaiba	23.1 ± 15.8*	1050
Harina de carne de cerdo	22.0 ± 5.2*	1000
Harina de pollo (Nacional)	14.9 ± 5.7*	677.3
Harina de sangre de res (Prieto)	11.6 ± 1.1*	527.3
Harina de carne de res (rastros)	10.8 ± 4.6*	490.9
Pasta de coco	10.4 ± 1.5*	472.7
Harina de pescado (Acua)	10.4 ± 4.7*	472.7
Harina de carne y vísceras de pollo	9.6 ± 1.8*	436.4
Harina de sangre de res	8.8 ± 4.7*	400
Harina de pescado	8.3 ± 0.6*	377.3
Harina de pollo	8.2 ± 1.2*	372.7
Harina de maíz amarillo	7.7 ± 1.8*	355
Harina de grano de maíz	7.3 ± 5.3*	331.8
Pasta de soya	6.9 ± 4.1*	313.6
Harina de calamar	6.9 ± 2.4*	313.9
Harina de trigo	6.4 ± 2.7*	290.9
Harina de canola	6.2 ± 4.1*	281.8
Hidrolizado de pescado	6.1 ± 1.8*	277.3
Salvado de trigo	5.0 ± 0.9*	227.3
Harina de sangre de cerdo	4.9 ± 0.8*	222.7
Harina de sangre de res (Texcoco)	4.3 ± 0.2*	195.5
Pulido de arroz	4.0 ± 1.8	181.2
Harina de soya	3.9 ± 1.9	177.3
Harina de canavalia	3.4 ± 1.6	154.5
Harina de sorgo	2.7 ± 2.3	122.7
Gluten de trigo	2.3 ± 0.2	104.5
Hemoglobina	2.2 ± 0.5	100
Harina de plasma porcino	2.1 ± 0.5	95.5
Gluten de maíz	0.6 ± 0.3	27.3

*Ingredientes proteínicos cuyos GH ácidos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (hemoglobina).

las, en tanto que la harina de canola posee aproximadamente 36 % de proteína cruda (Nackz *et al.* 1998), es rica en lisina y aminoácidos sulfurados (Uppström 1995). Sin embargo, es necesario considerar su inclusión en dietas artificiales en acuicultura, ya que la canola contiene taninos, glucosinolatos, ácido fítico y elevados niveles de fibra, que actúan como factores antinutrientes (Bell 1993). En cuanto a la harina de coco, puede ser una fuente de proteína y ácidos grasos insaturados a considerar, al menos para *C. urophthalmus*; más aún, mostró altos niveles GH en ambas fases de la hidrólisis, además

de que es un insumo de mucho menor costo que las fuentes de proteína de origen animal, siendo además muy abundante en el sureste de México.

Por otro, lado las técnicas que se basan en la reacción del o-phthaldialdehído con los aminoácidos (Nielsen *et al.* 2001), son otra herramienta útil que permiten complementar los estudios de digestibilidad *in vitro*. Con lo que respecta a los valores ALT que resultaron de la hidrólisis ácida de ingredientes proteínicos, destacan las harinas de sangre porcina, de plasma porcino, de carne y vísceras de pollo como ingredientes de origen animal,

Table 4. Valores finales de los grados de hidrólisis (GH) fase alcalina y digestibilidad relativa (%) de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (caseína).

Table 4. Final values of the degrees of hydrolysis (GH) of the alkaline stage and relative digestibility (%) of the test protein ingredients and reference ingredient (casein).

Ingrediente	GH (%)	Digestibilidad relativa (%)
Harina de carne de cerdo	31.6 ± 2.2*	458
Harina de sangre de res (Texcoco)	26.7 ± 2.2*	386.9
Harina de carne y vísceras de pollo	22.7 ± 4.3*	329
Harina de pollo (Nacional)	21.9 ± 1.6*	317.4
Pasta de coco	21.6 ± 5.2*	313
Harina de pescado	21.2 ± 3.6*	307.2
Harina de pescado (Acua)	21.1 ± 4.5*	305.8
Harina de sangre de res (rastros)	16.1 ± 0.4*	233.3
Harina de sangre de res (Prieto)	14.7 ± 2.4*	213
Harina de carne de res	14.6 ± 0.5*	211.6
Harina de pollo	14.0 ± 4.6*	202.9
Hidrolizado de pescado	12.8 ± 2.4*	185.5
Harina de soya	11.9 ± 1.1*	172.5
Harina de canola	10.9 ± 7.7*	158
Harina de grano de maíz	10.6 ± 4.1	153.6
Harina de calamar	10.4 ± 2.8	150.7
Pulido de arroz	8.9 ± 4.8	129
Gluten de trigo	8.3 ± 6.3	120.3
Gluten de maíz	8.3 ± 1.7	120.3
Harina de sangre de cerdo	8.2 ± 1.7	118.8
Harina de maíz amarillo	8.2 ± 2.4	118.8
Caseína	6.9 ± 1.8	100
Harina de sorgo	6.2 ± 3.3	89.9
Harina de camarón	5.9 ± 1.8	85.5
Harina de plasma porcino	5.5 ± 1.0	79.7
Pasta de soya	5.4 ± 2.8	78.3
Harina de canavalia	5.3 ± 2.0	76.8
Harina de trigo	4.8 ± 3.3	69.6
Salvado de trigo	3.5 ± 2.0	50.7
Harina de jaiba*	2.2 ± 0.7	31.9

*Ingredientes proteínicos cuyos GH alcalinos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (caseína).

seguidos de la harina de sorgo, de canavalia, maíz grano, de canola y de pasta de coco. No obstante que los valores ALT de estos ingredientes no revelaron diferencias significativas respecto del ingrediente de referencia, es necesario poner énfasis que las harinas de carne y vísceras de pollo, de sangre porcina, de maíz grano, de canola y de pasta de coco, observaron valores GH intermedios durante la fase ácida, lo que le puede hacer un objeto de más estudios como fuentes potenciales de proteína para *C. urophthalmus*. No así con las harinas de plasma porcino, de sorgo y de canavalia que obtuvieron GH ácidos ínfimos. En condiciones alcalinas los ALT más relevantes

y que a su vez observaron valores GH alcalinos significativamente por arriba del ingrediente de referencia, correspondieron a las harinas de cerdo, de carne y vísceras de pollo, de canola y el hidrolizado de pescado, que por consiguiente es posible considerarlos como fuentes potenciales de proteína para *C. urophthalmus*. Son menos meritorias de considerarse las harinas de trigo, de camarón, de jaiba, de sorgo y pulido de arroz, puesto que presentaron valores GH alcalinos bajos.

Son escasos los estudios en lo que se refiere a la evaluación de ALT de ingredientes proteínicos que se probaron en el presente estudio. Es posible com-

Table 5. Valores finales de la liberación de aminoácidos totales (ALT) fase ácida de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (hemoglobina).

Table 5. Final values of the concentration of total free amino acids (ALT) of the acid stage of the test protein ingredients and reference ingredient (hemoglobin).

Ingrediente	ALT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Hemoglobina	1293.1 \pm 24.1
Harina de sangre porcina	1018.7 \pm 53.6
Harina de plasma porcino	814.4 \pm 13.8
Harina de carne y vísceras de pollo	793.9 \pm 21.1
Harina de sorgo	759.3 \pm 7.1
Harina de canavalia	613.9 \pm 10.6
Harina de grano de maíz	600.5 \pm 8.3
Pasta coco	591.9 \pm 4.1
Harina de calamar	569.9 \pm 31.1
Harina de canola	545.5 \pm 30.0
Pasta soya	456.7 \pm 32.0
Salvado de trigo	441.8 \pm 13.0
Harina de maíz amarillo	435.5 \pm 8.3
Pulido de arroz	430.0 \pm 16.1
Harina de pescado (Acua)	428.4 \pm 8.3
Harina de trigo	414.3 \pm 7.6
Harina de pollo	411.9 \pm 2.7
Harina de jaiba	404.8 \pm 19.2
Hidrolizado de pescado	391.5 \pm 12.5
Gluten de maíz	341.9 \pm 8.5
Harina de carne res	322.3 \pm 6.8
Harina de camarón	319.9 \pm 13.6
Harina de carne de cerdo	310.5 \pm 33.0
Harina de pescado	293.2 \pm 7.2
Harina de soya	292.4 \pm 6.2
Harina de sangre de res (rastró)	287.7 \pm 2.4
Harina de sangre de res (Texcoco)	273.5 \pm 2.4
Harina de pollo (Nacional)	263.3 \pm 7.2
Gluten de trigo	241.3 \pm 5.9*
Harina de sangre de res (Prieto)	204.4 \pm 2.7*

*Ingredientes proteínicos cuyos ALT ácidos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (hemoglobina).

parar el valor ALT de la harina de carne y vísceras de pollo (631.2 ± 3.6 y $1830.8 \pm 9.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, condiciones ácida y alcalina respectivamente), que encontraron Frías-Quintana *et al.* (2010) en *A. tropicus*, mientras que los ALT de *C. urophthalmus* que se obtuvieron en la presente investigación fueron 793.9 ± 21.1 y $1587.8 \pm 13.0 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente; lo que refleja cierta similitud en los ALT de ambas especies. Aunque *A. tropicus* es de hábitos carnívoros, *C. urophthalmus* es una especie omnívora, con cierta tendencia a la carnivoría (Chávez-Lomelí *et al.* 1989). Por otro lado, cabe hacer hincapié el hecho de que en condiciones alcalinas, se

observaron varios valores ALT por encima del referente (caseína), en contraste con el referente (hemoglobina) que obtuvo el mayor valor ALT en condiciones ácidas. Es posible notar también que fueron más valores ALT alcalinos que resultaron estar por encima de los $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Lo anterior puede ser un indicador de que gran parte del proceso digestivo de ingredientes proteínicos se efectúa en el intestino de *C. urophthalmus*, lo cual también pudiera ser confirmado por la mayor concentración de proteasas alcalinas, con relación a la concentración de proteasas ácidas encontradas en este estudio. Aunque los valores GH y ALT de ingredientes de prueba en hari-

Table 6. Valores finales de la liberación de aminoácidos totales (ALT) fase alcalina de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (caseína).

Table 6. Final values of the concentration of total free amino acids (ALT) of the alkaline stage of the test protein ingredients and reference ingredient (casein).

Ingrediente	ALT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Harina de carne y vísceras de pollo	1587.8 \pm 13.0*
Harina de trigo	1442.4 \pm 12.1*
Harina de camarón	1237.3 \pm 13.6*
Harina de jaiba	1142.2 \pm 19.2*
Harina de pescado	1105.2 \pm 14.2 *
Pulido de arroz	1101.3 \pm 10.8*
Hidrolizado de pescado	1098.1 \pm 19.6*
Harina de sangre porcina	1070.6 \pm 17.8*
Harina de carne de cerdo	1013.2 \pm 20.3*
Harina de pollo	1007.0 \pm 14.7*
Harina de canola	0992.8 \pm 7.1*
Harina de sorgo	0976.3 \pm 6.2*
Caseína	0943.3 \pm 14.7
Harina de pollo (Nacional)	0940.1 \pm 21.4
Harina de sangre de res (Texcoco)	878.8 \pm 14.2**
Harina de pescado (Acua)	0819.9 \pm 1.4**
Harina de sangre de res (rastros)	0793.9 \pm 13.4**
Salvado de trigo	0782.9 \pm 12.5**
Harina de canavalia	0774.3 \pm 16.6**
Gluten de maíz	0742.8 \pm 18.9**
Harina de calamar	0719.6 \pm 11.8**
Harina de sangre de res (Prieto)	662.7 \pm 17.8**
Pasta soya	0641.4 \pm 4.7**
Harina de soya	0589.6 \pm 11.8**
Pasta coco	0574.6 \pm 11.9 **
Harina de plasma porcino	573.8 \pm 7.6**
Harina de carne res	0572.3 \pm 9.5**
Harina de maíz amarillo	0542.4 \pm 13.1**
Harina de grano de maíz	0527.4 \pm 11.9**
Gluten de trigo	0449.6 \pm 8.3**

*Ingredientes proteínicos cuyos ALT alcalinos presentan diferencias significativas mayores ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (caseína).

nas de sangre porcina, de calamar, de maíz amarillo y de grano de maíz no presentaron diferencias significativas, con lo que respecta a la caseína utilizada como referente en la hidrólisis alcalina; si resultaron ser significativos con relación a la hemoglobina (ingrediente control), referente de la hidrólisis ácida. Resulta relevante observar en condiciones ácidas el hecho de que la hemoglobina haya mostrado uno de los valores GH más moderados de los 29 ingredientes probados, en contraste con su valor ALT. Ello puede implicar la realización de más estudios para corroborar estos resultados.

En general de los 29 ingredientes de prueba que

presentaron valores GH y ALT significativamente mayores a los ingredientes referentes (hemoglobina/caseína), al término de la hidrólisis ácida y alcalina, fueron la harina de carne y vísceras de pollo, de carne de cerdo, de canola, pasta de coco y el hidrolizado de pescado. De entre éstos, vale la pena mencionar a la pasta de coco, por ser un ingrediente abundante la mayor parte del año en el sureste de México, además de ser menos costoso, que las harinas de pescado y otras fuentes de proteína de origen animal probadas en los ensayos. Cabe mencionar también que muchos de los ingredientes probados en el presente estudio obtuvieron valores GH (ácidos y alcali-

nos) aún por encima de los valores GH de las harinas de pescado (Pedregal) y de pescado (Acua). Es menester no pasar por alto que insumos como las carne y vísceras de pollo, la sangre porcina y sangre de res (subproductos de desecho de la industria ganadera y avícola) cuyas harinas observaron valores altos ya sea GH o ALT, incluso algunos por arriba de los ingredientes referentes, puedan ser objeto de más estudios, con el fin de considerárseles como fuentes potenciales de proteína para el cultivo de *C. urophthalmus*, o aun cuando solo hayan observado altos valores GH (ácidos o alcalinos) y no en sus respectivos valores ALT, o viceversa. Considerando lo anterior, sobresale que la gran cantidad de ingredientes que pueden ser utilizados para la formulación de una dieta balanceada específica para esta especie, con lo que considerando su requerimiento de proteína (45 %), permitirá incluirlos de tal manera que pueda disminuirse el uso de harina de pescado como la principal fuente

de proteína (Martínez-Palacios 1987; Martínez-Palacios et al. 2006). En la presente investigación se encontraron valores GH y ALT de gran parte de ingredientes probados, que pueden suponer la realización de estudios posteriores de sustitución parcial de harina de pescado en dietas experimentales, como fuentes potenciales de proteína alternativas hacia el diseño de dietas inertes para *C. urophthalmus*.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgar la beca para los estudios de doctorado. El autor agradece al proyecto "Identificación de ingredientes en alimentos balanceados y su digestibilidad en el cultivo experimental de peces nativos en Tabasco" Fondos Mixtos CONACyT.

LITERATURA CITADA

- Alarcón FJ, Moyano JF, Díaz M (2002) Evaluation of different protein sources for aqua feeds by an optimized pH-stat system. *Journal Science Food Agriculture* 82: 697-704.
- Álvarez-González, CA (2003) Ontogenia enzimática y nutrición larvaria de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis Doctoral. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. 180 pp.
- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- Bell JM (1993) Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 73: 679-697.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254.
- Concha-Frías B (2007) Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias del Mar, UCN, Coquimbo, Chile 130 pp.
- Chávez-Lomelí MO, Mattheeuws MH, Vega P (1989) Biología de los peces del Rio San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. NIREB/FUCID. 222 pp.
- Chong A, Hashim R, Bin-Ali A (2002) Inhibition of protease activities in *Discus symphysodon* spp. By three plant meals. *Aquaculture International* 10: 433-441.
- Church FC, Swaisgood H, Porter D, Catignani G (1983) Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal Dairy Science* 66: 1219-1227.
- Cuenca CA, Álvarez-González CA, Ortiz-Galindo JL, Nolasco-Soria H, Tovar-Ramírez D, Guerrero-Zárate R, Castillo-Domínguez A, Perera-García MA, Hernández-Gómez R, Gisbert E (2013a) Partial characterisation of digestive proteases of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. In Press: 1-12.
- Cuenca CA, Alvarez-González CA, Ortiz-Galindo JL, Tovar-Ramírez D, Guerrero-Zárate R, Aguilar-Hernández S, Perera-García MA, Hernández-Gómez R Gisbert E (2013b) Histological development of the digestive system of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther 1862). *Journal of Applied Ichthyology*, In Press: 1-9
- Debnath D, Pal AK, Sahu NP, Yengkokpam S, Baruah K, Choudhury D, Venkateswarlu G (2007) Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 146: 107-114.

- Dimes LE, Haard N (1994) Estimation of protein digestibility: Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol* 108(A): 349-362.
- Dumas A, de Lange CFM, France J, Bureau DP (2007) Quantitative description of body composition and rates of nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 263: 165-181.
- Ezquerro JM, García-Carreño F, Civera-Cerecedo R, Haard N (1997) pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 157: 251-262.
- Fenerci S, Sener E (2005) *in vivo* and *in vitro* protein digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 5: 17-22.
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill 1863). *Universidad y Ciencia* 26(2): 265-282.
- Grabner M (1985) An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture* 48: 97-110.
- Kaushik SJ, Seiliez I (2010) Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish. *Aquatic Research* 41: 322-332.
- Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *The Journal of General Physiology* 30: 291-310.
- López-Ramírez G, Cuenca-Soria CA, Alvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Ortiz-Galindo JL, Perales-García N, Márquez-Couturier G, Arias-Rodríguez L, Indy JR, Contreras-Sánchez WM, Gisbert E, Moyan FJ (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 197-208.
- March BE, Macmillan C, Ming FW (1985) Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 47: 275-292.
- Martínez-Palacios CA (1987) Aspects of the biology of *Cichlasoma urophthalmus* (Günther) with particular reference to its culture. Tesis Doctoral. Institute of Aquaculture University of Stirling, Escocia 321 pp.
- Martínez-Palacios CA, Harfush-Melendez M, Chávez-Sánchez C, Ross LG (2006) The optimum dietary protein level for the Mexican cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther): a comparison of estimates derived from experiments using fixed rate feeding and satiation feeding. *Aquaculture Nutrition* 2(1): 11-20.
- Nackz M, Amarowicz A, Sullivan A, Shahidi F (1998) Current research developments on polyphenolics of rapeseed / canola: A review. *Food Chemistry* 62: 489-502.
- Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 66(5): 642-646.
- Nolasco H, Martínez A, Hinojosa P, Civera-Cerecedo R, Vega-Villasante F (2006) Digestibilidad *in vitro* de lípidos alimentarios para el camarón. 377-395 pp. En: Cruz Suárez LE, Ricque Marie D, Tapia Salazar M, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Puello Cruz AC, García Ortega A (eds) *Avances en Nutrición Acuícola VIII*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Pérez J, Moyano JF, Alarcón JF (2003) Evaluación del efecto de inhibidores de proteasas presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú *Piaractus mesopotamicus* y Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). 442-454 pp. En: *Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*. <http://www.civa2003.org>.
- Saunders RM, Conner MA, Booth AN, Bickoff EM, Kohler GO (1972) Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *Journal of Nutrition* 103: 530-535.
- Shiau S, Liang H (1995) Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *Journal of Nutrition* 125: 976-982.
- Uppström B (1995) Seed chemistry. 217-243 pp. En: Kimber D, McGregor DI (eds) *Brassica Oilseeds: Production and Utilization*. Cab International. Wallingford, Oxford, Reino Unido.
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinham 5: 270-277.
- Zar JH (2010) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, EUA. 960 pp.