

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Estudios de digestión y absorción dinámica de proteínas *in vitro*
empleando el intestino invertido de atún aleta azul (*Thunnus*
orientalis).

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

EMMANUEL MARTÍNEZ MONTAÑO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ABRIL, 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Ensenada, Baja California, a 5 de mayo del 2011.

H. Comité de Estudios de Posgrado
Posgrado en Oceanografía Costera

El que suscribe M.C. Emmanuel Martínez Montaña alumno del posgrado de Oceanografía Costera con número de matrícula 319740. Me dirijo a ustedes para informales que mi directora de tesis y mis sinodales, los abajo firmantes, han decidido que mi escrito de tesis que lleva por título: "Estudios de digestión y absorción dinámica de proteínas *in vitro* empleando el intestino invertido de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*)", cumple con los requisitos para ser defendida y de esta manera cumplir con los lineamientos para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

De esta manera, solicitamos de la manera más atenta que el examen de Defensa de Tesis sea el día martes 17 de mayo del 2011 a las 17:00 horas en el auditorio del IIO.

Sin otro asunto por el momento y esperando una respuesta favorable de su parte, agradezco la atención dada a la presente y quedo a su disposición para cualquier aclaración.

A T E N T A M E N T E



M. en C. Emmanuel Martínez Montaña
Estudiante de Doctorado



Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de Tesis



Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Sinodal



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal



Dr. Rafael Vásquez Duhalt
Sinodal



Dr. Eduardo Durazo Beltrán
Sinodal

RESUMEN de la tesis de **Emmanuel Martínez Montaña**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA. Ensenada, Baja California, México. Abril 2011.

Estudios de digestión y absorción dinámica de proteínas *in vitro* empleando el intestino invertido de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*).

La maricultura del atún aleta azul del Pacífico (AAA; *Thunnus orientalis*) es una actividad acuícola con importancia económica. Varios estudios han recomendado realizar investigación acerca de los requerimientos nutritivos, el desarrollo de alimentos formulados y la optimización del cultivo, para, darle mayor sustentabilidad a la industria. Sin embargo, diversos factores hacen difícil realizar experimentos *in vivo*. Por lo que es necesario recurrir a metodologías *in vitro* para evaluar el aprovechamiento de los nutrientes simulando procesos fisiológicos y condiciones ambientales. Una de estas metodologías es el sistema dinámico del intestino invertido utilizado para medir las tasas de absorción intestinal de aminoácidos (AAs) en peces marinos. En este trabajo se tuvo como primer objetivo, evaluar el efecto de la concentración proteica de un hidrolizado de músculo de sardina en la absorción de AAs en el intestino proximal del AAA. El músculo de sardina fue hidrolizado en dos etapas: la primera con pepsina de origen porcino a un pH ácido, seguida de una digestión alcalina usando extractos pancreáticos del AAA. Tres concentraciones del hidrolizado fueron usadas (0.14, 0.09 y 0.06 mg de proteína soluble mL⁻¹). En general, los AAs no esenciales (AANE; principalmente Ala, Glu y Gly) fueron absorbidos preferencialmente a los AAs esenciales (AAE). Se observó que para los AAs catiónicos, hubo una mayor afinidad hacia Arg y Lys, en comparación a His. Las tasas de absorción altas encontradas para AAs neutros glucogénicos tales como Ala y Gly, muestran los elevados requerimientos energéticos celulares en el AAA. La absorción total de AAs tales como Asp, Leu y Pro fueron afectados por la concentración proteica del hidrolizado, lo que pudiera indicar la importancia de los procesos de absorción no saturables o de difusión pasiva para estos AAs; aunque esta suposición debe ser esclarecida. Un segundo objetivo del trabajo consistió en evaluar la absorción *in vitro* de AAs a lo largo del tubo intestinal del AAA usando dos diferentes fuentes de proteína hidrolizada (músculo de sardina fresca y harina de soya) empleando el sistema del intestino invertido. Tubos intestinales del AAA fueron disectados en tres regiones (proximal, media y distal) de acuerdo a sus características anatómicas y morfológicas. El análisis cromatográfico de los AAs mostró que el hidrolizado de músculo de sardina fresca (HMS) y el hidrolizado de soya (HS) contienen altas concentraciones de AAs esenciales (AAE) con relación a los AAs no esenciales (AANE). Sin embargo, los perfiles de AAs absorbidos mostraron

una absorción preferencial hacia AANE glucogénicos. Únicamente Lys mostró un gradiente decreciente en la tasa de absorción de la región proximal a la distal. Mientras que las tasas de absorción del resto de los AAs no mostraron tendencia alguna al utilizar ambos hidrolizados en las diferentes regiones intestinales evaluadas. Estos resultados demuestran la alta capacidad de absorción para los AAs a lo largo del tubo intestinal, lo que pudiera ser una estrategia evolutiva para compensar la corta longitud intestinal y las rápidas tasas de evacuación observadas en los tónidos. En general, una reducción en las tasas de absorción de los AAs fue observada cuando el HS fue utilizado, aún cuando el contenido inicial para ciertos AAs (Asp, Leu y Tyr) fuera similar en los hidrolizados. Las diferencias en las tasas de absorción entre las dos fuentes proteicas, son consistentes con experimentos *in vivo* hechos en otras especies acuáticas, en los cuales se ha observado un bajo aprovechamiento de proteína de soya, en contraste al emplear harina de pescado, en parte esto se ha explicado por la baja digestibilidad proteica reportada para la harina de soya. Adicionalmente, existen otros factores anti nutricionales que podrían estar interfiriendo en los procesos de absorción intestinal o inhibidores enzimáticos que no fueran totalmente eliminados durante el tratamiento. Las concentraciones de Tau fueron significativamente altas en todos los ensayos realizados en el presente estudio. Sin embargo, la Tau cuantificada pudo provenir de depósitos intracelulares presentes en los tejidos intestinales, y no necesariamente de los hidrolizados tras procesos de absorción intestinal o de una transaminación. El sistema dinámico del intestino invertido acoplado al sistema de digestión *in vitro* del pH stat, ha resultado ser una herramienta útil para evaluar el potencial de la biodisponibilidad y absorción de AAs provenientes de los ingredientes proteicos. Los resultados generados por este sistema podrían servir al momento de formular alimento para peces.

Palabras clave: absorción de aminoácidos, atún aleta azul, digestibilidad proteica, hidrólisis proteica, intestino invertido, sistema dinámico gastrointestinal.

ABSTRACT from the thesis presented by **Emmanuel Martínez Montaña** as a partial requirement to obtain the DOCTORATE degree on COASTAL OCEANOGRAPHY SCIENCE. Ensenada, Baja California, Mexico. April 2011.

***In vitro* studies of protein digestion and amino acid absorption using the everted intestine system of bluefin tuna (*Thunnus orientalis*).**

Ranching of the Pacific bluefin tuna (PBT; *Thunnus orientalis*) is a commercial industry with economical importance worldwide. Several reports pointed out the importance of research on the nutrient requirements, to develop formulated feeds and to promote the sustainability in the industry. However, several factors difficult to perform *in vivo* experiments, and therefore, it is necessary to develop alternative *in vitro* methodologies to measure nutrient assimilation by simulating the physiological processes inside the organism under different controlled conditions. Everted intestine system is a technique able to measure the intestinal absorption rates of amino acids (AAs). The first goal of this work was to evaluate the effect of protein concentration on the AA absorption on the proximal intestine from the PBT using a hydrolysate solution from sardine muscle. The sardine muscle was hydrolyzed in two steps: first, an acidic digestion with porcine pepsin, followed by an alkaline digestion using pancreatic extract from the PBT. Three concentrations of the hydrolysate solution were used (0.14, 0.09, and 0.06 mg of soluble protein mL⁻¹). In general, absorption of non-essential amino acids (NEAA; mainly Ala, Glu and Gly) were preferred when compared with essential amino acids (EAA). For cationic AAs, a higher affinity for Arg and Lys was observed than these for His. High absorption rates were found for neutral glucogenic AAs, such as Ala and Gly suggesting an elevated cellular energetic requirement of PBT. Total absorption rates of some AAs, such as Asp, Leu and Pro were influenced by the protein concentration of the hydrolysate solution, which may indicate the importance of the non-saturable processes or passive diffusion of these AAs. The second objective of this work was to evaluate the *in vitro* study of absorption rates of AAs along the intestinal tract of PBT using two sources of hydrolyzed protein (fresh sardine muscle and soybean meal). Chromatographic amino acids analyses showed that both sardine muscle (FSH) and soybean meal (SMH) hydrolysates contain high concentrations of essential AAs (EAA) compared to non-essential AAs (NEAA). However, the profiles of absorbed AAs showed a preferential absorption for glucogenic NEAA. Only Lys showed a decreasing proximal-to-distal gradient in absorption rates between the different intestinal regions for both FSH and SMH. Whereas no tendency in absorption rates was observed for the rest of the AAs. These results demonstrate the high absorption capacity for AAs along the intestinal tract in PBT, which could be an evolutionary strategy to compensate for the short intestinal length or the rapid evacuation rates reported for tunas. In general, a

reduction of AAs absorption rates was observed when SMH was used compared to FSH, even if the initial content for certain AAs (i.e. Asp, Leu and Tyr) was similar in both hydrolysate solutions. Differences in the absorption rates between protein sources were consistent with the *in vivo* experiments reported for several aquatic species, which could be explained by the low bioavailability reported for soybean meal. Additionally, some antinutritional factors and/or enzymatic inhibitors not efficiently removed during the treatment of the meal might be present in soybean meal and could have had an effect on absorption rates. Taurine was found at high concentrations in all treatments, probably arising from the intracellular deposits present in the intestinal tissues, and not necessarily from the hydrolysates or transamination processes. The dynamic system of the everted intestine coupled to with the pH Stat *in vitro* digestion system, appears to be a useful tool for assessing the potential of AAs bioavailability and absorption from potential protein sources. Results generated by this assay will be provided useful information for formulating efficient fish diets.

Keywords: Amino acid absorption, bluefin tuna, protein digestibility, protein hydrolysis, everted intestine, gastrointestinal dynamic system.

DEDICATORIA

A mi esposa María Isaura Bañuelos Vargas, por su amor, apoyo y total comprensión en todo momento. También por ser una de las personas a quien más admiro, ya que es un ejemplo de vida, éxito y voluntad. Espero seguir creciendo junto con ella personal y profesionalmente. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la **Dra. María Teresa Viana Castellón** por su gran amistad y constante guía, por el orgullo de formar parte de su equipo de trabajo, sus conocimientos compartidos y ser un ejemplo de Investigador que ama y disfruta de su trabajo.

A mis sinodales, el **Dr. Armando Shimada Miyasaka**, el **Dr. Juan Gabriel Correa Reyes**, el **Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**, el **Dr. Rafael Vásquez Duhalt** y el **Dr. Eduardo Durazo Beltrán**, por su tiempo brindado y sus recomendaciones y correcciones realizadas para llevar a buen término este trabajo de tesis.

Al **M.C. Emyr Saúl Peña Marín** por su amistad y valiosa ayuda durante el muestreo y la realización de los ensayos y análisis en el laboratorio hechos para el presente estudio.

A las empresas **Bajamachi S.A. de R.L.** y **Maricultura del Norte S.A. de C.V.** por la donación de muestras biológicas.

Al **CONACYT** por otorgarme una beca durante tres años para realizar mis estudios de doctorado.

A todos aquellos compañeros y amigos que hemos trabajado en el **Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva de Organismos Acuáticos**, en especial a Ariana Román, Daniel Badillo, Fernando Barreto, Griselda Parés, Ivette Carrillo, Jaime García, Jorge Hernández, Marco Antonio Ponce, Martha Martínez, Moisés Marcial, Selene Herrera y Servando Rueda. Les agradezco su amistad y su constante retroalimentación científica, así como también todos los momentos gratos que hemos vivido juntos.

A mi familia, por su apoyo en la lejanía.

CONTENIDO

	PÁGINA
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.1 Antecedentes.....	12
<i>I.1.1 Anatomía intestinal en los juveniles de atún.....</i>	12
<i>I.1.2 Fisiología de las enzimas proteolíticas digestivas en el atún aleta azul del Pacífico (<u>T. orientalis</u>).....</i>	16
<i>I.1.3 Fisiología de la absorción proteica intestinal en los peces marinos.....</i>	19
<i>I.1.4 Metodologías empleadas para evaluar la absorción intestinal</i>	27
I.2 Hipótesis.....	32
I.3 Objetivos.....	33
<i>I.3.1 Objetivo general.....</i>	33
<i>I.3.2 Objetivos específicos.....</i>	33
2. CAPÍTULO I. Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (<i>Thunnus orientalis</i>): in vitro uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. (Artículo publicado en Aquaculture, 299 (2010): 134-139)	

CONTENIDO (Continuación)

	PÁGINA
<p>3. CAPÍTULO II. <i>In vitro</i> amino acid absorption using hydrolyzed sardine muscle or soybean meal at different intestinal regions of the Pacific bluefin tuna (<i>Thunnus orientalis</i>). (Artículo aceptado en Aquaculture nutrition, doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00850.x)</p>	
<p>4. Discusión general.....</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>IV.1 La absorción intestinal preferencial de los aminoácidos no esenciales sobre los aminoácidos esenciales del atún aleta azul <u>T. orientalis</u>.....</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>IV.2 Absorción intestinal e interacciones entre la arginina y la lisina.....</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>IV.3 La alta capacidad de absorción de AAs en el tubo intestinal del atún aleta azul <u>T. orientalis</u>.....</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>IV.4 La absorción intestinal del aminoácido libre taurina.....</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>IV.5 Limitantes del uso del sistema dinámico del intestino invertido para evaluar la absorción intestinal en peces y otros problemas a resolver.....</i></p>	<p>34</p> <p>36</p> <p>39</p> <p>43</p> <p>48</p> <p>50</p>
<p>5 Conclusiones.....</p>	<p>52</p>
<p>6 Recomendaciones generales.....</p>	<p>55</p>
<p>7 Literatura citada.....</p>	<p>57</p>

LISTA DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Cuadro 1	Sistema de transporte para los α -aminoácidos que han sido identificados en los enterocitos intestinales.....	22

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1	Distribución geográfica del atún aleta azul (<i>T. orientalis</i>) en el Océano Pacífico.....	2
Figura 2	Rutas involucradas en la absorción intestinal de aminoácidos (AA), péptidos (Pep) y proteínas.....	21

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los atunes pertenecen a la clase Actinopterygii, orden Perciformes y la familia Scombridae, la cual contiene cerca de treinta y tres especies y subespecies. De éstas, las especies de mayor interés comercial para las pesquerías y la acuicultura basada en la captura son el atún aleta azul del Atlántico *Thunnus thynnus* (en ocasiones referido como la subespecie *T. thynnus thynnus*) la cual está presente en los mares Mediterráneo y Negro; el atún aleta azul del Pacífico *Thunnus orientalis* a menudo referido como la subespecie *T. thynnus orientalis* presente en el norte del Pacífico; el atún aleta azul sureño *Thunnus maccoyii* presente en el sur del Pacífico y más recientemente, el atún aleta amarilla *Thunnus albacares* y el atún ojo grande *Thunnus obesus*, los cuales habitan las aguas Mexicanas, del sur de California y Hawaii (Ottolenghi, 2008).

El atún aleta azul del Pacífico *T. orientalis*, subespecie a la que se refiere el presente trabajo de tesis, se distribuye desde el Golfo de Alaska hasta el sur de California y Baja California en el Pacífico oriental. En el Pacífico occidental se presenta desde las islas Sakhalin en el mar de Okhotsk, Rusia hasta el norte de Filipinas (Figura 1; Collete y Nauen, 1983). Los juveniles de éstos habitan en aguas epipelágicas, mientras que los atunes adultos más grandes tienden a ser mesopelágicos y habitar en aguas más profundas y frías. *T. orientalis* desova cerca de Japón y Filipinas desde abril a junio, y en el mar de Japón en Agosto. Se ha llegado a reportar que cuando las hembras pesan entre 270 y 300 kg, pueden llegar a producir más de 10 millones de huevos en la temporada de desove.



Figura 1. Distribución geográfica del atún aleta azul (*T. orientalis*) en el Océano Pacífico (Collette y Nauen, 1983).

La alimentación de *T. orientalis* es muy variada y depende de la talla del organismo. Los peces de 20 a 65 cm de longitud consumen anchovetas, macarelas, sardinas y otros peces, además de crustáceos y calamares, mientras que los atunes de tallas mayores comen peces, tanto pelágicos como demersales, incluyendo otros atunes y calamares (Collette y Nauen, 1983).

Una de las principales características fisiológicas de los atunes que les ha permitido expandir su nicho térmico, y por lo tanto, su distribución cosmopolita en los océanos, es que a pesar de ser organismos ectotermos poseen cierta endotermia regional corporal. Esta heterotermia como resultado de la combinación de ambas, está localizada en la zona torácica de alta producción metabólica y

consiste en una red vascular de las venas y arterias entrelazada que dan lugar a la producción de calor por contra-corriente (*retia mirabilia*), lo que les permite la retención o disipación rápida de calor metabólico del músculo rojo y blanco, vísceras, cerebro y ojos, según la actividad y profundidad de natación del pez (Altringham y Block, 1997; Graham y Dickson, 2004). Dicha adaptación evolutiva de los túnidos, así como de algunos reptiles e incluso algunos mamíferos marinos como ballenas, les permite incrementar hasta 10°C la temperatura de músculo axial (Carey y Lawson, 1973) o mantener una temperatura estomacal promedio de 25°C en aguas con un rango de temperatura entre 5 a 18°C (Stevens y McLeese, 1984).

Aparte de sus adaptaciones endotérmicas, los atunes poseen un cuerpo fusiforme altamente especializado, piel, aletas y estructuras corporales hidrodinámicas, así como también una aleta caudal lunada, estas características morfológicas les permiten una natación eficiente, rápida y sostenida (Altringham y Block, 1997). Además, gozan de una combinación de músculo blanco para iniciar movimientos de alta velocidad y músculo rojo para una natación constante. Dichas adaptaciones, les confieren a los atunes una natación singular conocida como natación tuniforme, en la cual la ondulación corporal lateral es mínima y todo el empuje se concentra en la aleta caudal lunada que oscila rápidamente (Graham y Dickson, 2004).

Por último, aunado a la heterotermia regional y una natación tuniforme, poseen una elevada capacidad aeróbica; estas características son propias de los

atunes y que no comparten con otros teleósteos (Graham y Dickson, 2004). Los túnidos requieren grandes cantidades de oxígeno para mantener su alto nivel metabólico. Para ello, hacen pasar grandes cantidades de agua sobre sus agallas, se ha estimado que el flujo del agua a través de sus branquias es 5 a 10 veces más alto que otros peces. Debido a esto, necesitan nadar constantemente con la boca abierta, ya que a diferencia de la mayoría de los peces, son incapaces de hacer pasar agua sobre las agallas cuando están inmóviles. Además, sus estructuras branquiales maximizan el contacto entre el agua y el epitelio respiratorio, y minimizan el espacio muerto anatómico y fisiológico, lo que permite una eficiencia de extracción de oxígeno mayor al 50 % (comparado con 25-33% en otros peces). Asociado a esto, poseen de 7 a 9 veces más área superficial branquial que la trucha arcoíris (Brill y Bushnell, 2001; Graham y Dickson, 2004).

La maricultura del atún aleta azul del Pacífico *Thunnus orientalis*, es una actividad acuícola que inició en México hace 15 años y que llegó a mostrar un crecimiento acelerado en los últimos años, como consecuencia de la gran derrama económica que genera. Esta actividad se basa en la captura de juveniles silvestres para su posterior confinamiento en jaulas flotantes. Desde el punto de vista técnico-operacional, la maricultura del atún puede ser dividida en las fases de (1) captura y transporte, (2) alimentación-engorde (3) cosecha y (4) venta (Zertuche-González *et al.*, 2008). El engorde de los atunes juveniles capturados se realiza con la finalidad de incrementar el contenido de lípidos corporales a una razón de 10 g Kg⁻¹ por semana, alcanzando un máximo de 200 g de lípidos por kilogramo

de carne en un periodo de 4 a 6 meses. En los ranchos atuneros mexicanos se han reportado tasas de crecimiento mensual entre 5 - 8% del peso total (Pedersen e Ito, 2010). El ciclo de producción para la engorda del atún va de 3 a 8 meses, dependiendo del sitio en donde se encuentre localizada la granja y del tamaño inicial de los animales. Sin embargo, en la actualidad algunas granjas han comenzado a mantener los peces en confinamiento por más de 18 meses con el objetivo de darle un valor agregado al producto, dependiendo de la talla de captura y el precio del mercado (pesos mayores a 35 Kg), lo que pudiera darle más sustentabilidad a la industria.

En granjas localizadas en la costa noroeste de Baja California, la producción de atún aleta azul del Pacífico (*T. orientalis*) para los años 2003-2008, fue de 3,000 a 5,000 toneladas métricas (TM), con ventas totales aproximadas de USD \$80 millones anuales (Del Moral-Simanek y Vaca-Rodríguez, 2009). Durante esos años, el 90% fue exportado a Japón, 9% exportado a los Estados Unidos, mientras que alrededor del 1% fue vendido dentro de México en un mercado creciente (Pedersen e Ito, 2010). Para el año del 2007, México fue el segundo exportador de atún aleta azul fresco a Japón, con 33.7% del valor de la producción (Japan External Trade Organization, 2007, reportado por Del Moral-Simanek y Vaca-Rodríguez, 2009). Sin embargo, el crecimiento constante de la producción atunera ha comenzado a mostrar un decline en estos dos últimos años, llegándose a reportar cosechas menores a 2,500 TM anuales, siendo la crisis económica internacional y la caída de los precios del atún en el mercado japonés los

principales factores que afectaron negativamente a la industria. A pesar de ello, características ambientales y antropogénicas, tales como condiciones climáticas templadas, carecer de huracanes, una abundante fuente de alimentos pelágicos capturados localmente, la proximidad a aeropuertos internacionales, regulaciones económicas favorables, mano de obra barata y la presencia de las tres especies de túnidos de mayor importancia comercial (el atún aleta azul *T. orientalis*, el atún aleta amarilla *T. albacares* y el atún ojo grande *T. obesus*) hacen que la costa de Baja California sea una zona adecuada y de gran potencial de crecimiento para la maricultura del atún (Sylvia, 2007).

En México, el atún aleta azul es alimentado principalmente con sardina del Pacífico fresca (*Sardinops sagax caerulea*), empleándose de 20,000 a 30,000 TM de este producto durante los meses de engorde (Zertuche-González *et al.*, 2008), aunque ocasionalmente se utiliza también anchoveta, macarela y calamar. Estas grandes cantidades de alimento empleadas, se deben a las elevadas tasas de conversión alimenticia (TCA; alimento húmedo/ ganancia de peso húmedo) reportadas para los túnidos, las cuales están entre 7 y 20 para *T. orientalis* (Ikeda, 2003; Sylvia, 2007), de 9 para *T. obesus* (Sylvia *et al.*, 2003), de 10 para *T. albacares* (Sylvia *et al.*, 2003), entre 15 y 25 para *T. thynnus* (Aguado *et al.*, 2004; Aguado-Giménez y García-García, 2005) y entre 10 y 17 para *T. macoyii* (Fernández *et al.*, 2007). No obstante, dichas TCA son inconsistentes si se comparan con coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA) de nitrógeno (N) reportados por Aguado *et al.* (2004), los cuales son de 68% y 94%, dependiendo

del método de colecta de las heces (disección intestinal y colección directa, respectivamente) al usar como alimento peces que poseían concentraciones de N total entre 82 y 106 g K-1 en peso seco. Lo cual podría deberse a que los estudios previamente citados, fueron todos ellos realizados *in situ* durante las operaciones de engorda, bajo condiciones ambientales poco controladas y con alimentos que poseen variabilidad alta en su calidad nutricia. O por otro lado, debido a las estrategias inapropiadas de alimentación en donde, las dietas son comúnmente dadas a saciedad una sola vez al día (Aguado *et al.*, 2004), lo que aunado al comportamiento voraz de los atunes al momento de alimentarse (Mourente y Tocher, 2009) y al intestino corto de los atunes, hacen que el tránsito intestinal sea acelerado, lo que reduce el aprovechamiento de sus nutrientes.

Varios autores han hecho hincapié en la necesidad de desarrollar alimentos formulados con la finalidad de asegurar un mejor control de la calidad alimenticia y sanitaria del alimento a emplear, diversificar las fuentes proteicas y lipídicas (Ottolenghi *et al.*, 2004; Zertuche-González *et al.*, 2008) y mejorar las TCA. En Australia y México, algunas granjas han comenzado a diseñar y utilizar alimentos formulados, tanto secos como embutidos de sardina y otros pelágicos menores, empleando en estos últimos intestinos de puerco, celulosa, colágeno u otras membranas (Clarke *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 1999; Charat y Valdez, 2008). En las granjas de atún mexicanas se había observado cierta reticencia al uso de alimentos formulados, teniendo como pretextos de su falta de uso a los altos costos de producción, los pocos estudios elaborados para evaluar su desempeño

y la oposición/resistencia del mercado japonés que considera que el sabor y la textura de la carne depende de la estrategia alimenticia empleada (Ottolengui, 2008). Sin embargo, la percepción está cambiando poco a poco con la caída reciente de precios del atún aunado a un mejor conocimiento sobre las bondades de un alimento formulado.

Para alcanzar la sustentabilidad de esta actividad acuícola, se recomienda el desarrollo del cultivo completo del atún, además de seguir investigando sobre sus requerimientos nutricionales y optimización de su cultivo con el desarrollo de dietas formuladas.

A pesar de ello, a la fecha son pocos los estudios de nutrición y fisiología digestiva realizados con los túnidos en comparación a los reportados con otros peces ya sean dulceacuícolas o marinos. La mayoría de las investigaciones han sido hechas con la especie del aleta azul de Atlántico *T. thynnus* presente en el Atlántico nororiental o con las especies del atún sureño *T. maccoyii* y aleta azul *T. orientalis*, presentes en el Pacífico sur (Australia) y occidental (Japón). En México, existen algunos estudios que se enfocan a la descripción enzimática del atún aleta azul *T. orientalis* (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007) así como a la sustentabilidad de su cultivo (Zertuche-González *et al.*, 2008; Del Moral-Simanek y Vaca-Rodríguez, 2009).

El tamaño corporal grande, la natación continua y rápida debido a sus hábitos pelágicos, la selectividad que muestran hacia sus presas, pero sobretodo

el costo económico y laboral que conlleva el maricultivo de los atunes, son factores que hacen sumamente difícil la realización de experimentos *in situ* con un número adecuado de repeticiones (Aguado *et al.*, 2004). Aunado a esto, sólo un número limitado de ensayos pueden llegar a ser realizados durante el periodo de engorda (Carter *et al.*, 1999). Por otro lado, es imprescindible la pronta generación de conocimiento acerca de su fisiología, los requerimientos nutricionales y el aprovechamiento de los nutrientes, conocimiento que pudiera orientarse en el diseño de alimentos formulados que ayuden al desarrollo de la industria de la maricultura atunera con respecto a la industria pesquera de la sardina.

Es por esto que es necesario recurrir a técnicas indirectas de evaluación que nos permitan medir la utilización y aprovechamiento de los nutrientes de los organismos en el laboratorio, simulando los procesos fisiológicos digestivos y las condiciones de campo. Las metodologías *in vitro* han sido rutinariamente utilizadas para evaluar la digestibilidad de ingredientes empleados en alimentos para animales terrestres y acuáticos (Boissen y Egum, 1991; Alarcón-López, 1997; Moyano y Savoie, 2001; Morales y Moyano, 2010). En estudios que vayan más allá de la digestibilidad, como lo es la absorción intestinal, se encuentran metodologías *in vitro* empleadas en la industria de producción animal, así como la farmacológica humana desde hacía varias décadas, lo cual ha sido de gran ayuda para evaluar la absorción de nutrientes en pollos (Kushak y Basova, 1988; Yamauchi, 2007) y cerdos (Buddington *et al.*, 2001; Awati *et al.*, 2009), así como fármacos para humanos (Balimane *et al.*, 2000; Youdim *et al.*, 2003). En estudios

con peces, se reportan numerosos estudios para determinar la absorción de nutrientes en un sistema estático (Balocco *et al.*, 1993; Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Berge *et al.*, 1999, 2004; Bogé *et al.*, 2002; Shimada-Borges *et al.*, 2010) en los que se evalúa la absorción de un sólo aminoácido (AA) o un grupo pequeño de éstos, sin considerar las posibles interacciones con otros. Una modificación a estas técnicas es la reportada por Rosas *et al.* (2008) quienes reportaron un sistema dinámico del intestino invertido, en el cual se evalúan las tasas de absorción intestinal de aminoácidos (AAs) en atún aleta azul, totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando un digerido pancreático de caseína (BactotriptonTM), encontrando diferencias en la absorción de AA entre las especies. Este sistema dinámico posee distintas ventajas en comparación con otras metodologías empleadas para evaluar la absorción de AAs, entre las principales se encuentran: (1) poder evaluar la absorción de un grupo de AAs en una mezcla compleja de ellos, estimando posibles interacciones; (2) medir la absorción intestinal de forma cinética; (3) y calcular la eficiencia de absorción bajo diferentes condiciones fisiológicas o ambientales.

Es por esto, que resulta necesario realizar estudios que simulen en la mejor forma posible los procesos digestivos cuando sea difícil su observación *in vivo*. De tal manera que el objetivo general del presente trabajo es generar conocimiento sobre la absorción intestinal de grupos de AAs provenientes de fuentes distintas de proteína empleando tejidos vivos de atún aleta azul del Pacífico *T. orientalis* criados en granjas marinas en Ensenada B.C., México. Es así que se midió la

cinética de absorción a partir de fuentes proteicas disponibles para los alimentos formulados como harina de músculo de sardina fresca y harina de soya. Además de que para simular al máximo los procesos biológicos, se emplearon extractos de enzimas pancreáticas del atún aleta azul y los ensayos de absorción se realizaron bajo condiciones fisiológicas óptimas reportadas para esta especie (relación enzima/proteína, temperatura, pH, ambiente osmótico y relación O_2/CO_2).

I.1 Antecedentes

I.1.1 Anatomía intestinal en los juveniles de atún

El atún aleta azul del Pacífico *T. orientalis*, al igual que el resto de los túnidos, es una especie carnívora que posee un estómago grande bien definido, un sistema de sacos ciegos llamados ciegos pilóricos y un tracto intestinal corto (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007).

La masa de ciegos pilóricos, es un órgano difuso característico de los atunes que se encuentra presente inmediatamente por detrás del píloro y estómago y en el cual se encuentra embebido tejido pancreático. Este órgano está conformado por miles de sacos ciegos cortos, que están agrupados y dispuestos de forma paralela unos a otros, y que poseen pliegues o microvellosidades para incrementar el área superficial postgástrica de absorción (Stevens y McLeese, 1984; Buddington y Diamond, 1987). Estructuralmente es similar al intestino proximal o superior, cuyo epitelio columnar está conformado por células mucosas exocrinas (células acinares) secretoras de mucus, bicarbonato y ciertas enzimas digestivas de tipo alcalinas; células endocrinas glandulares (células β y γ) productoras de hormonas que regulan el proceso de digestión y de hormonas que regulan el metabolismo; y un gran número de enterocitos que poseen funciones de absorción y digestión (Rust, 2002).

En estudios de cinética de absorción de aminoácidos (AAs), péptidos y carbohidratos que han sido realizados con salmónidos y truchas, se ha

encontrando que la región de los ciegos pilóricos y la parte proximal del intestino pueden llegar a absorber cerca del 84 al 92% de los productos de la hidrólisis proteica (Buddington y Diamond, 1987; Bakke-McKellep *et al.*, 2000). Las altas tasas de absorción calculadas para los ciegos pilóricos, son el resultado de la amplia área superficial que le confieren los miles de divertículos que lo conforman. Sin embargo, su estructura anatómica es tan compleja que no es tan fácil realizar estudios de absorción sencillos, sino que es necesario el uso de marcadores de gran precisión como son los isotopos radionivelados. Es esta la razón por la cual en el presente estudio no se cuantificó la absorción de AAs en este órgano. Sin embargo, nos enfocaremos en medir la cinética de la absorción de AAs a lo largo del tracto intestinal para evaluar su capacidad de absorción y como la fuente proteica puede afectarla.

Para el atún aleta azul del Pacífico *T. orientalis* no se han realizado estudios anatómicos e histológicos que describan al sistema de los ciegos pilóricos; sin embargo, su estructura y morfología es de complejidad similar al descrito en la subespecie del Atlántico *T. thynnus*, donde se han cuantificado 20,000 sacos de aproximadamente 10 cm, en ciegos pilóricos de 9 Kg en atunes de 500 Kg (Stevens y McLeese, 1984).

El papel principal del intestino, en peces que poseen un estómago funcional, es la absorción selectiva de los nutrientes ingeridos y digeridos por los organismos. En la mayoría de los peces carnívoros, se distinguen tres regiones

intestinales acorde a sus funciones fisiológicas (Ferraris y Ahearn, 1984; Alarcón-López, 1997; Rust, 2002):

1. La región anterior (también llamada superior, intestino corto o ascendente), es la más cercana al estómago y se caracteriza por exhibir un extenso pliegue de la mucosa para aumentar su área superficial de absorción, recibir las secreciones pancreáticas (enzimas digestivas, bicarbonato y mucus) y las secreciones biliares. El epitelio en la mucosa intestinal en esta región está conformado por células de tipo columnares y calciformes (goblets), las cuales poseen una gran capacidad de absorción y secreción.
2. La región media, que es una zona de transición entre las regiones anterior y posterior.
3. La región posterior (también llamada inferior, intestino grande o descendente, recto o grueso), es caracterizada por una elevada actividad pinocítica de sus células epiteliales y la presencia de gránulos intracelulares con macromoléculas proteicas. En los peces carnívoros, esta región intestinal también posee un epitelio con capacidad de absorción, pero el plegamiento está considerablemente menos desarrollado que la región anterior; además de que este epitelio está compuesto principalmente por células escamosas y calciformes que secretan principalmente mucus.

De forma similar a lo descrito por Matus-de-la-Parra *et al.* (2007) y Rosas *et al.* (2008), para fines de estudio se dividió al tubo intestinal del atún aleta azul *T. thynnus* en tres regiones claramente evidentes, en base a diferencias en su

capacidad enzimática, morfología, la presencia de dobleces o curvas intestinales y la localización con respecto a otros órganos digestivos. De esta manera, las tres regiones identificadas son: (1) la región proximal referida a la sección inmediatamente posterior a la masa de los ciegos pilóricos; (2) la región entre la primera y segunda curva intestinal llamada región media; y, (3) la región distal que comprende la sección intestinal desde la segunda curvatura y la región rectal-anal.

De acuerdo a morfometrías realizadas por nuestro grupo de investigación en juveniles de atún aleta azul mantenidos en cautiverio en jaulas flotantes presentes en Baja California, México, el tracto intestinal es muy corto en relación a la longitud corporal (longitud intestinal relativa: longitud intestinal/ longitud furca = 0.3) comparada con la longitud intestinal relativa de peces omnívoros y herbívoros (0.75 y 6 para bagre y tilapia, respectivamente). En peces estrictamente carnívoros tales como los atunes y salmónidos, adaptaciones evolutivas tales como una gran cantidad de enzimas estables con eficiencia constante, una enorme área superficial para mezclar, hidrolizar y absorber; y para el caso de los atunes, una temperatura visceral alta, les permite compensar este intestino corto y así procesar cantidades grandes de nutrientes requeridos para mantener un estado metabólico altamente activo (Stevens y McLeese, 1984; Bakke-McKellep *et al.*, 2000).

I.1.2 Fisiología de las enzimas proteolíticas digestivas en el atún aleta azul del Pacífico (T. orientalis)

En los peces carnívoros que poseen un estómago bien desarrollado, como es el caso de los atunes, el proceso de digestión proteica está constituido por dos fases una de ellas incluye la fase ácida en el estómago, llevada a cabo por la acción química del HCl y la acción bioquímica de la pepsina; y otra alcalina, llevada a cabo por enzimas exoproteasas (tripsinas, quimiotripsinas, entre otras) que son sintetizadas en el páncreas y vertidas al lumen intestinal. Estas a su vez son complementadas por la acción de enzimas endopeptidasas (amino- y carboxipeptidasas) que actúan en la membrana del borde de cepillo de la mucosa intestinal (Alarcón-López, 1997).

El estómago de *T. orientalis*, muestra altos niveles de actividad proteasa ácida tipo pepsina utilizando hemoglobina al 2% como sustrato (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007), concordando con estudios reportados por Essed *et al.* (2002) para la subespecie de atún aleta azul del Atlántico, *T. thynnus*. La actividad digestiva de estas proteasas ácidas se realiza en el estómago por la endoproteasa (enzima que hidroliza enlaces peptídicos internos) pepsina y posee un intervalo de pH óptimo entre 2 y 3, pero su actividad decrece hasta desaparecer a un pH de 5 (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007), a diferencia de las enzimas ácidas de *T. thynnus* que son estables a pH de 7 o 9. Tanji *et al.* (1988) purificaron tres pepsinógenos (pepsinógenos 1, 2 y 3) de la mucosa gástrica de *T. orientalis*, que se distinguen por diferir en sus masas moleculares (40.4, 37.8 y 40.1 kDa, respectivamente), en

las relaciones molares entre algunos aminoácidos y modos de activación, lo que le confiere a esta especie al igual que otros túnidos una gran capacidad de digestión tipo ácida, característica de las especies netamente carnívoras (Essed *et al.*, 2002).

Tanto el sistema de los ciegos pilóricos, como el resto del tracto intestinal del atún aleta azul *T. orientalis*, posee una actividad proteolítica alta tipo alcalina. En los túnidos, esta actividad es generada principalmente por la acción de las endopeptidasas tripsina y la quimiotripsina, cuyo pH óptimo de actividad catalítica para ambas enzimas es alrededor de 8 y disminuye al incrementar o disminuir el pH de este valor (Klomklao *et al.*, 2006). En contraste, Stevens y McLeese (1984) determinaron que el pH óptimo de la tripsina en el atún aleta azul del Atlántico *T. thynnus* es de 9.4. Tales diferencias pueden ser resultado de factores extrínsecos (régimen y la fuente alimenticia) o intrínsecos a la forma en cómo es evaluada la actividad (especificidad del sustrato; Klomklao *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha observado que estas enzimas proteolíticas alcalinas poseen cierta estabilidad a pH ligeramente ácidos, lo cual es una adaptación fisiológica al continuo vaciamiento del estómago por la voracidad que se observa en los atunes (Essed *et al.*, 2002).

A diferencia del atún del Atlántico *T. thynnus*, en donde la actividad de la tripsina y la quimiotripsina se detecta únicamente en la región de los ciegos pilóricos (Stevens y McLeese, 1984), en el atún del Pacífico *T. orientalis* ésta se detecta a lo largo del tracto intestinal donde se observa un gradiente de

disminución desde los ciegos pilóricos a la región distal o posterior (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007). Se ha reportado para *T. thynnus* que en la masa de los ciegos pilóricos, la actividad de las tripsinas es muy superior al de las quimiotripsinas (Stevens y McLeese, 1984; Essed *et al.*, 2002). De la misma manera, en nuestro laboratorio (resultados aún no publicados) midiendo la tripsina y quimiotripsina con un sustrato común e inhibidores específicos, se demostró que la tripsina es responsable del 80% de actividad mientras que la quimiotripsina solo del 15%. Esto es de esperarse, si consideramos que las tripsinas juegan papeles importantes en procesos biológicos tales como la digestión y la activación de zimógenos de enzimas tales como la quimiotripsina, elastasas, colagenasas y lipasas (Rust, 2002; Klomklao *et al.*, 2007).

Aunado a la acción de las principales proteasas endopeptidasas (pepsina, tripsina y quimiotripsina), se encuentra la actividad catalítica de exopeptidasas (enzimas que rompen enlaces peptídicos presentes en los extremos libres de las cadenas de polipéptidos) tales como aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Estas enzimas secretadas por los enterocitos intestinales (aminopeptidasas) y/o por el páncreas exocrino (carboxipeptidasas) son enzimas ligadas a la membrana de borde de cepillo del intestino o de los ciegos pilóricos y actúan de un pH neutro a uno ligeramente alcalino (Alarcón-López, 1997; Rust, 2002). Matus-de-la-Parra *et al.* (2007), evaluaron la actividad de la Leu-aminopeptidasa en juveniles y determinaron que es similar a lo largo del tracto intestinal; sin embargo, su actividad no fue evaluada en el sistema de los ciegos pilóricos. Esta enzima

mostró una actividad óptima a un pH entre 8 y 9 en la parte anterior o proximal del intestino; sin embargo, en la parte media y distal del intestino, el pH óptimo fue de 8, tendiendo a disminuir a pH mayores o menores a este, lo que de acuerdo a Matus-de-la-Parra *et al.* (2007) sugiere la presencia de isoenzimas.

1.1.3 Fisiología de la absorción proteica intestinal en los peces marinos

Después de los procesos de digestión gástrica e intestinal, los aminoácidos (AAs) pueden ser absorbidos como AAs libres o péptidos pequeños (di- o tripéptidos), dependiendo de la capacidad de absorción, la región intestinal y el estadio ontogénico de los organismos. Sin embargo, en las etapas larvarias de algunos peces marinos caracterizados por su pobre o ausente desarrollo de glándulas gástricas, los AAs son obtenidos como proteínas intactas por medio de micropinocitosis e intracelularmente digeridas por acción de fosfatasas ácidas y catepsinas (Zacarías-Soto *et al.*, 2006).

Los AAs libres son transportados del lumen intestinal a la capa serosa a través de los enterocitos (absorción intestinal), lo que involucra varios mecanismos fisiológicos tales como (1) rutas no saturables o difusión independiente de acarreadores, también conocida como difusión aparente, (2) transporte facilitado y (3) transporte activo (Mailliard *et al.*, 1995).

El transporte facilitado y el activo son realizados por un gran número de proteínas transportadoras transmembranales (sistemas de transporte) que poseen diferentes grados de especificidad para diferentes clases de AAs, a los cuales reconocen y transfieren a través de la membrana apical o de borde de cepillo (la membrana que mira hacia la luz intestinal, correspondiente a la cara mucosa) hacia la membrana basolateral (aquella que mira hacia el espacio intersticial y los capilares linfático y sanguíneo, correspondiente a la capa serosa) de los enterocitos, actuando solas o en combinación con otras proteínas (Mailliard *et al.*, 1995; Matthews, 2000).

En el transporte activo, los acarreadores requieren energía para funcionar y son Na^+ dependientes, pues co-transportan un ión Na^+ y un AA hacia el interior del enterocito; sin embargo, para mantener un gradiente de Na^+ en donde el Na^+ extracelular es alto y el Na^+ intracelular es bajo, se requiere de la participación de una ATPasa Na^+/K^+ que se localiza en la membrana basolateral de los enterocitos (Figura 2). En contraste, en el transporte pasivo los sistemas de transporte son Na^+ independientes, es decir, no están acoplados al Na^+ y no requieren energía metabólica (ATP) para transportar un AA a favor de un gradiente de concentración (Webb, 1990).

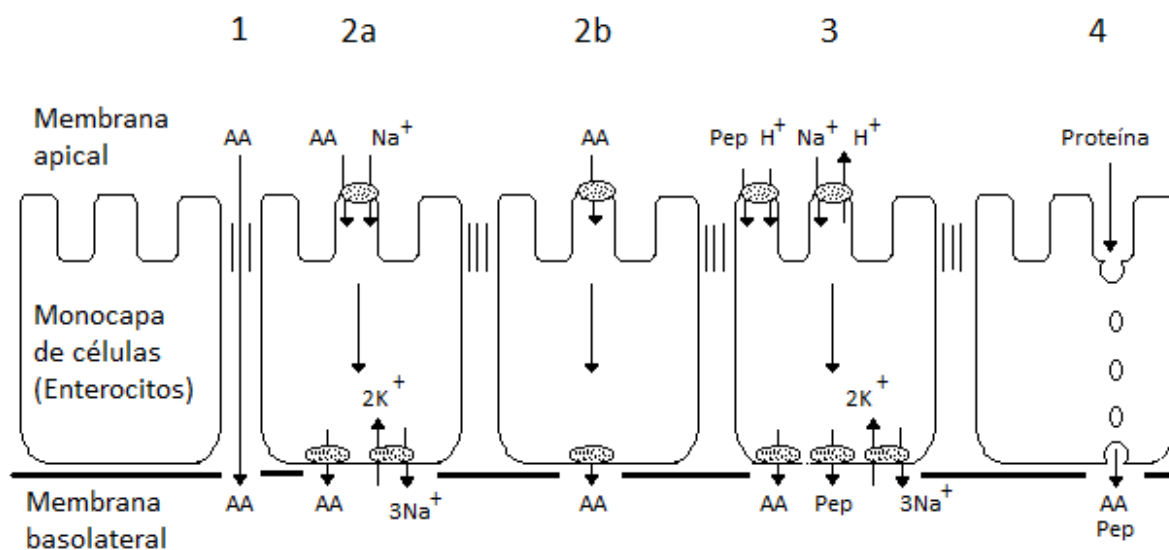


Figura 2. Rutas involucradas en la absorción intestinal de aminoácidos (AA), péptidos (Pep) y proteínas. (1) Ruta paracelular de AA; (2) Rutas transcelulares de AA: (2a) transporte activo, (2b) transporte pasivo; (3) Rutas transcelulares de los péptidos; y (4) Pinocitosis de proteínas (entrada a los enterocitos) y su exocitosis como AA (salida de los enterocitos).

Los sistemas de transporte para los α -AAs han sido agrupados y clasificados en familias de acuerdo a la especificidad del sustrato, la fuente de energía requerida y si están o no acoplados al transporte de algún ión (Na^+ , K^+ , Cl^- y/o H^+ ; Figura 2; Cuadro 1; Matthews, 2000). El grado de especificidad de los sistemas es diferente entre las familias y varía desde el sistema IMINO, el cual es específico para prolina, hasta el sistema $\text{B}^{0,+}$ el cual es aceptado por la mayoría de los AAs catiónicos y dipolares; sin embargo, no reconoce a los β -AAs (p.ej. la taurina). Por otra parte, el reconocimiento y transporte de un AAs depende del grupo α -amino o α -imino (para prolina) y un grupo carboxilo; y es determinado de manera importante por el tamaño, la carga y/o la configuración de las cadenas del

AA; sin embargo, los AAs con estructuras diversas a menudo comparten sistemas de transporte o traslape (Christensen, 1984).

Cuadro 1. Sistema de transporte para los α -aminoácidos libres que han sido identificados en los enterocitos intestinales, tanto en su membrana celular apical (Ap) y basolateral (Bs; Cuadro basado en Ganapathy *et al.*, 1994; Matthews, 2000; Mailliard *et al.*, 1995).

Sistema de transporte	Sustrato	Iones acoplados	Localización en el enterocito	
A	Todos los neutros, Pro	Na ⁺	Ap	Bs
ASC	Neutros (pH 7.5), Aniónicos (pH 5.5)	Na ⁺	Ap	Bs
asc	Neutros			Bs
B (NBB, B ⁰)	Mayoría de los neutros	Na ⁺	Ap	
B ^{0,+}	Neutros y catiónicos	Na ⁺ o Cl ⁻	Ap	
b ^{0,+}	Mismos que B ^{0,+}		Ap	Bs
y ⁺	Catiónicos		Ap	Bs
L	Neutros ramificados		Ap	Bs
X _{AG} ⁻	D-,L-Asp, L-Glu	Na ⁺ ,K ⁺	Ap	
IMINO	Pro, hydroxy-Pro	Na ⁺ ,Cl ⁻	Ap	

Los sistemas de transporte se designan mediante una letra con base en el sustrato AA que prefieren y si requieren o no la presencia de un ion Na⁺ para su activación o co-transporte (Cuadro 1). Los sistemas de transporte Na⁺ - dependiente son designados por letras mayúsculas y los sistemas Na⁺ - independientes por letras minúsculas. Sin embargo, el sistema L es inconsistente a esta clasificación, ya que se designa mediante una letra mayúscula, sin que el

sistema de transporte este acoplado a un ion. Las letras X e Y están reservadas para los sistemas que transportan los AA ácidos y básicos, respectivamente. En cambio, el sistema IMINO únicamente transporta prolina y otros imino ácidos. En el cuadro 1, se muestran sólo los sistemas de transporte que existen en la membrana celular (ya sea apical o basolateral) de los enterocitos intestinales y su requerimiento o no de algún ion para su transporte.

Como se observa en el Cuadro 1, algunos de los sistemas transportadores presentes y propios de la membrana apical de los enterocitos son distintos a los que se observan en la membrana basolateral, lo cual tiene como objetivos (1) auxiliar en las procesos fisiológicos intestinales especializados tales como la digestión y transporte del lumen a la serosa (para los sistemas presentes en la membrana apical) y (2) jugar un papel importante en la absorción y post absorción al transportar los solutos hacia dentro y fuera de los enterocitos, respectivamente, participando en las reacciones del metabolismo intermedio visceral (para los sistemas presentes en la membrana basolateral (Mailliard *et al.*, 1995; Wu, 1998).

La absorción intestinal de AAs en peces ha sido ampliamente estudiada en estudios *in vitro* empleando tejidos de los organismos bajo estudio y AA marcados con isótopos radioactivos, en los cuales se ha observado que los procesos fisiológicos son similares al de los vertebrados superiores tales como los mamíferos (Bogé *et al.*, 2002). No obstante, se ha observado una mayor dependencia de los sistemas transportadores hacia iones tales como el Na⁺, principalmente en peces marinos carnívoros como lo documentan estudios

realizados con anguila europea *Anguilla anguilla* (Vilella *et al.*, 1990), la corvina europea *Dicentrarchus labrax* (Balocco *et al.*, 1993) y el salmón del Atlántico (Nordrum, 2000); así como también en otros iones tales como el Cl^+ (Bogé *et al.*, 2002).

Además de la absorción mediada por los transportadores proteicos, los AAs y péptidos pueden también ser absorbidos mediante canales de membrana, rutas paracelulares y/o por endocitosis, mecanismos conocidos generalmente como transporte por difusión aparente. Sin embargo, sus tasas de absorción son mucho menores en comparación a los procesos mediados por transportadores y su contribución a la absorción total dependerá de la concentración intra- y extracelular de los sustratos, su tamaño y carga, la magnitud de las señales que afectan la endocitosis y los niveles energéticos intracelulares (Matthews, 2000). De acuerdo a Nordrum *et al.* (2000), los peces de agua dulce son más dependientes del transporte por difusión aparente, en contraste a los peces marinos que son dependientes del transporte mediado por acarreadores. Esto se relaciona con las diferencias en cuanto a la permeabilidad epitelial del intestino (el epitelio de los peces dulceacuícolas es más permeable en comparación a los marinos). Además, se sabe que peces eurihalinos que son llevados del agua dulce a la marina, durante su proceso de adaptación, se incrementa la dependencia hacia los sistemas acarreadores a consecuencia de un aumento en la concentración luminal de Na^+ proveniente del agua marina ingerida (Ferraris y Ahearn, 1984). De acuerdo a Bakke-McKellep *et al.* (2000) y Nordrum *et al.*

(2000), la difusión aparente parece ser particularmente importante para la absorción total del imino ácido Pro y los AAs neutros Met y Leu.

Con respecto a los péptidos, la absorción intestinal se da mediante un acarreador proteico activo (PepT), perteneciente a una gran familia de transportadores de oligopéptidos, conocida como familia transportadora de protón/oligopéptido (POT, por sus siglas en inglés) o transportadora de péptidos (PTR, por sus siglas en inglés). El PepT se caracteriza por ser de baja afinidad y con un rango amplio de especificidad hacia sustratos peptídicos (principalmente di- y tripéptidos). En mamíferos se ha cuantificado que pueden transportar más de 8000 diferentes sustratos muchos de ellos peptidomiméticos e incluso algunos ácidos grasos amino-omega simples que no contienen un enlace peptídico (Daniel, 2004), siendo incapaces de transportar AAs libres y tetrapéptidos (Rubio-Aliaga y Daniel, 2008). Por lo tanto, las características estructurales mínimas y esenciales que debe de poseer un sustrato para unirse y ser transportado por el PepT, es poseer dos grupos extremos con cargas opuestas (p.ej. grupo amino y carboxy) separados por un esqueleto carbonado con una distancia de 5.5 a 6.3 Å entre los centros de los grupos extremos (Daniel, 2004).

El transporte de péptidos se da en contra de un gradiente de concentración gracias a que está acoplado al transporte de un protón (H^+). Sin embargo, para que la entrada de protones no modifique el ambiente electroquímico citoplasmático del enterocito, es necesaria la actividad de un intercambiador Na^+/H^+ localizado en la membrana apical y que cataliza la entrada de Na^+ a la célula y la salida de H^+

hacia el lumen, a la vez que la ATPasa Na^+/K^+ localizada en la membrana basolateral mantiene una baja concentración de sodio intracelular (Walter *et al.*, 1996).

El mecanismo de transporte de péptidos en los peces es el mismo que el de otros vertebrados superiores. En el 2003, Verri y colaboradores lograron la expresión génica del transportador característico de mamíferos PepT1 en el pez cebra *Danio rerio*, y posteriormente se logró expresar en diversos peces como en el bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (Rønnestad *et al.* 2007), en el locha asiático *Misgurnus anguillicaudatus* (Gonçalves *et al.*, 2007), y en la corvina europea *Dicentrarchus labrax* (Hakim *et al.*, 2009; Terova *et al.*, 2009), entre otras especies. También el transportador de péptidos PepT2 se encontró en la carpa común *Cyprinus carpio* (Ostaszewska *et al.*, 2010), en donde se expresó en las células gliales entéricas (células del sistema nervioso cuya función es la de soporte y nutrición de las neuronas) y en macrófagos en la capa neuromuscular del tracto gastrointestinal. No obstante, se sabe que en los peces juveniles la proteína dietaria es absorbida principalmente en forma de AAs libres (Reshkin y Ahearn, 1991), contrario a lo observado en los mamíferos donde es absorbida principalmente en forma de péptidos (Abidi, 1997). Bakke-McKellep *et al.* (2000) mencionaron que esto podría deberse al número limitado de sistemas transportadores para péptidos presentes en los ciegos e intestinos de los peces juveniles.

1.1.4 Metodologías empleadas para evaluar la absorción intestinal

A la fecha son varios los métodos empleados para evaluar la absorción o permeabilidad de aminoácidos (AAs) a nivel intestinal, la mayoría de los cuales fueron diseñados por la industria farmacológica para la detección de compuestos con actividad biológica y propiedades farmacéuticas. En general, estos métodos pueden clasificarse en cinco grupos principales, teniendo a (1) los métodos fisicoquímicos; (2) métodos *in vivo*; (3) métodos *in situ*; (4) métodos *in vitro* ; y, (5) métodos *in silico*.

Los métodos fisicoquímicos se basan en la evaluación de parámetros de los compuestos tales como la lipofilicidad, la carga, el peso molecular, el volumen molar, pKa, solubilidad, pH gastrointestinal, entre otras (Genty *et al.*, 2001; Youdim *et al.*, 2003). Estos métodos son atractivos debido a su alta eficiencia y predictibilidad para estimar el transporte pasivo de las moléculas; sin embargo, no toman en cuenta las condiciones fisiológicas reales de los organismos y las interacciones entre membrana/compuesto, por lo que pueden conducir a conclusiones equivocadas (Balimane *et al.*, 2000).

Los métodos *in vivo* constan de administrar vía oral o intraperitoneal algún fármaco o compuesto de interés y un posterior muestreo sanguíneo para evaluar las tasas de absorción. Estos métodos han sido usados para extrapolar datos de permeabilidad o absorción intestinal de animales a humanos, basándose en la similaridad de la composición de las membranas celulares epiteliales entre los

mamíferos; sin embargo, hay factores fisiológicos que varían entre una y otra especie, tales como pH, motilidad gastrointestinal, tiempo de tránsito y distribución diferencial de las enzimas y transportadores que pueden afectar las tasas de absorción (Balimane *et al.*, 2000). En contraste, los métodos *in situ* cuantifican el decremento de un soluto en el lumen de segmentos intestinales perfundidos y en los cuales la irrigación sanguínea e inervación permanecen intactas. Sin embargo, estos últimos métodos poseen la desventaja de que la tasa de la disminución de la concentración del soluto no siempre representa su tasa de absorción hacia el sistema circulatorio, ya que se subestiman los procesos metabólicos presistémicos; además del efecto de la anestesia sobre el flujo intestinal (Uhing y Kimura, 1995).

Aunado a estos métodos, se han desarrollado diversos métodos *in vitro* menos laboriosos y a veces menos costosos comparados a las metodologías *in vivo*. Sin embargo, poseen la desventaja de no incorporar factores fisiológicos tales como las tasas de vaciado gástrico y tránsito intestinal, el pH gastrointestinal, etc., en la interpretación de los datos. A pesar de ello, son varios los sistemas usados rutinariamente, solos o en conjunto con otros métodos, como herramientas de decisión en el desarrollo temprano de fármacos. El empleo exitoso de los métodos o modelos *in vitro* para predecir la absorción de compuestos a través de la mucosa intestinal, dependerá de qué tan cerca éstos simulen las características del epitelio intestinal *in vivo* (Balimane *et al.*, 2000).

Los métodos *in silico* son aquellos en los que gracias a programas computacionales y de manera virtual, predicen de forma adecuada la permeabilidad de membranas de fármacos evaluados, basándose en datos de lipofilicidad, tamaño molecular, area superficial polar, capacidad de unión del hidrógeno de los compuestos (Stenberg *et al.*, 1999). Sin embargo, una de las principales críticas es el carecer de una base de datos lo suficientemente grande y con información confiable.

En estudios con peces marinos, son diversos los métodos *in vitro* empleados para evaluar la absorción intestinal de AAs, siendo los más empleados: (1) El método del intestino invertido empleando AAs o péptidos con radioisótopos como marcadores (p. ej. ^{14}C), el cual ha sido empleado en trabajos con bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (Buddington y Diamond, 1987; Berge *et al.*, 1994), esturiones (Karasov y Diamond, 1983) y salmónidos (Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Nordrum *et al.*, 2000; Berge *et al.*, 2004); (2) el método de las vesículas elaboradas con la membrana del borde de cepillo intestinal (BBMV, por sus siglas en inglés), empleado en estudios con anguila europea *A. anguilla* (Storelli *et al.*, 1989; Vilella *et al.*, 1990), corvina europea *Dicentrarchus labrax* (Balocco *et al.*, 1993) y salpa *Boops salpa* (Bogé *et al.*, 2002); (3) uso de cámaras especialmente diseñadas para el montaje de laminas intestinales y la evaluación de procesos de absorción o difusión pasiva empleando radioisótopos como marcadores (Balimane *et al.*, 2000) en estudios con el salmón chino *O. tshawytscha* (Schep *et al.*, 1997);

y (4) membranas artificiales que simulan las condiciones bioquímicas y/o fisiológicas de los tejidos intestinales (Morales y Moyano, 2010).

Uno de los métodos *in vitro* que posee gran potencial de uso es el sistema del intestino invertido modificado por Rosas *et al.* (2008), debido a sus características, entre las que destacan: (1) la evaluación de la absorción de AAs se puede realizar de manera dinámica (cinética de absorción); (2) la cinética de absorción de AAs individuales se puede ejecutar usando una mezcla compleja de AAs; (3) posee un alto grado de repetitividad; (4) se pueden mimetizar las condiciones fisiológicas de los organismos bajo estudio; (5) no se emplean radioisótopos (por lo que se evita permisos para el manejo y el riesgo de contaminación radioactiva); (6) es un método adaptable con el que no solamente se puede evaluar la absorción de AAs, sino también ácidos grasos y otros compuestos como toxinas (Santiago-Morales *et al.*, 2009); y (7) es menos costoso que otros métodos de evaluación *in vitro*.

Rosas *et al.*, (2008) emplearon el sistema del intestino invertido para evaluar la absorción intestinal de AAs provenientes de un digerido pancreático de caseína comercial (BactotryptoneTM; Difco) en tres especies de peces carnívoros: el atún aleta azul, la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y la trucha (*O. mykiss*); encontrando diferencias en la cinética de absorción de los AA entre los organismos de agua dulce y marino, así como el efecto de la viabilidad de los tejidos sobre la absorción preferencial de AA glucogénicos (Rosas *et al.*, 2008). Por su parte, Peña-Marín (2010), usando el sistema del intestino invertido en atún

aleta azul describió la interacción entre los AAs catiónicos lisina y la arginina, y observó una interacción no inhibitoria sino más bien transestimuladora, contrario a los estudios de Berge *et al.* (1999) en el salmón del Atlántico *Salmo salar*. Si bien, estos resultados son alentadores, será interesante conocer si esta velocidad de absorción se mantiene con diferentes fuentes proteicas y si esta misma absorción prevalece a lo largo de todo el intestino.

Por lo tanto, es imprescindible desarrollar modelos *in vitro* de mejor predicción, en los que no solo se simulen las condiciones fisiológicas del tracto intestinal y los procesos de absorción, sino también, los procesos digestivos del animal bajo estudio.

Una respuesta a este problema, pudiera ser el acoplamiento del sistema del intestino invertido a un sistema de digestión proteica *in vitro* como es el pH STAT. La hidrólisis proteica empleando la técnica del pH STAT, se realiza empleando cócteles multienzimáticos de proteasas comerciales o extractos enzimáticos digestivos de los organismos bajo estudio (Alarcón-López, 1997; Moyano y Savoie, 2001), lo que genera hidrolizados proteicos característicos para una especie en particular, dependientes de la fuente proteica y el extracto enzimático usados. De esta manera, sería plausible utilizar estos hidrolizados proteicos elaborados con enzimas digestivas propias de los organismos bajo estudio y no hidrolizados comerciales, que comúnmente están elaborados con enzimas proteolíticas provenientes de bacterias.

I.2 Hipótesis

Si la proteína es digerida por enzimas con cortes específicos y transportada de manera específica a través de transportadores que discriminen entre diferentes tipos de AAs, entonces, la variación del tipo de proteína dará lugar a perfiles distintos de AAs que provocarán variaciones en la absorción a lo largo del tubo intestinal.

I.3 Objetivos

I.3.1 Objetivo general

Estudiar la absorción intestinal de aminoácidos (AAs) empleando tejidos vivos de atún aleta azul del Pacífico *Thunnus orientalis* criados en granjas marinas comerciales presentes en Ensenada B.C., México, e hidrolizados proteicos de harina de músculo de sardina fresca y harina de soya. Para simular al máximo los procesos *in vivo*, se emplearon extractos de enzimas pancreáticas del atún aleta azul y los ensayos de absorción se realizaron bajo condiciones fisiológicas óptimas reportadas para esta especie (relación enzima/proteína, temperatura, pH, ambiente osmótico y relación O₂/CO₂).

I.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la absorción de AAs *in vitro* en la región proximal del atún aleta azul (*T. orientalis*) usando una mezcla de AAs obtenidos de un hidrolizado de sardina fresca digerida utilizando un extracto enzimático pancreático del atún aleta azul.
2. Evaluar la absorción de AAs a lo largo del tracto intestinal del atún aleta azul del Pacífico (*T. orientalis*) usando dos diferentes fuentes de proteína hidrolizada (músculo de sardina fresca y harina de soya) empleando el sistema del intestino invertido.

2. CAPÍTULO I



Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): *In vitro* uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations

Emmanuel Martínez-Montaña^a, Emyr Peña^a, Ulfert Focken^b, María Teresa Viana^{c,*}

^a Programa de Maestría y Doctorado en Oceanografía Costera, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada BC, Mexico

^b Department of Aquaculture Systems and Animal Nutrition in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim, 70593 Stuttgart, Germany

^c Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, PO Box 453, Ensenada BC 22860, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2009

Received in revised form 2 December 2009

Accepted 3 December 2009

Keywords:

Amino acid absorption

Digestibility

Everted intestine

Gastrointestinal dynamic system

Bluefin tuna

Protein digestion

Protein hydrolysis

ABSTRACT

The absorption rates of different amino acids (AAs) were compared using the everted intestine technique with fresh proximal intestinal sections from the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). Sardine muscle was hydrolyzed in two steps; first with porcine pepsin, followed by an alkaline pancreatic bluefin tuna extract. The hydrolyzed extract was tested in triplicate samples at three concentrations (0.14, 0.09, and 0.06 mg of soluble protein mL⁻¹). In general, the non-essential amino acids (NEAAs; mainly Ala, Glu, and Gly) were assimilated in preference to the essential amino acids (EAAs). It was observed that certain AAs, such as Arg and Lys, had more affinity with the cationic transporters than did His. The glucogenic AA Glu always displayed double the absorption rate observed for Asp, probably to satisfy an energy requirement of the cells. The neutral AAs, Ala and Gly, showed the highest absorption rates at all concentrations. Other AA relations are also discussed. This is the first study that evaluates the use of this gastrointestinal system to estimate AA absorption and kinetics from a natural pool of AAs obtained from sardine muscle hydrolyzed with bluefin tuna digestive enzymes.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) mariculture is one of the fastest-growing aquatic industries (FAO, 2007) and has become quite important in México over the last 5 years (Zertuche-González et al., 2008) with exports of up to 4350 metric tons (mt) per year at an average price of US\$20,000/mt. The production method involves the capture of juveniles into net cages near the coastline, followed by a fattening period of 4–9 months. Pacific bluefin tuna are usually fed with fresh or frozen Pacific sardine (*Sardinops sagax*) or mackerel, and occasionally whole squid. According to the statistics for bluefin tuna production, an estimated 20,000–30,000 mt of fresh feed needs to be consumed in order to obtain the commercial product required for the international market. Thus, the feed conversion ratio (FCR) when using fresh or frozen sardine is calculated to be 17 kg of sardines per kilogram of bluefin tuna (Sylvia, 2007), which is more than four times higher than that reported by Naylor et al. (2000) as the average for carnivorous marine fish in aquaculture. In a parallel study, Zertuche-González et al. (2008) demonstrated that the sardine fishery has not been similarly affected by this new commercial activity since the

maximum sustainable yield of 250,000 mt per year has not yet been attained. However, since there is great concern about using fresh high-quality fish such as sardine to feed farmed tuna, resulting in a negative overall production due to the FCR mentioned above, the development of formulated diets undoubtedly needs to be investigated.

Protein is the most important component in feeds, not only because of its high economic cost and high requirements in carnivorous fish diets but also because growth promoters are associated with some protein sources (Wilson, 2002). Protein quality is determined by many factors, such as amino acid profile and digestibility, which are both important for improving protein turnover (protein ingestion vs. protein accretion) and decreasing the organic content excreted in feces. The study of digestibility involves examining the digestion and absorption of nutrients for a given species, which is essential knowledge in aquaculture in order to determine the nutritional requirements of the species. However, this evaluation traditionally requires the collection of fecal material, which is a very difficult or impossible task in many aquatic species (Bureau et al., 1999). Moreover, even if these studies could be carried out, it would still be necessary to confine the animals in tanks, which for some species is not an option, either due to their pelagic behavior or their physical size. In consequence, the development of an *in vitro* methodology to represent the physiological digestion and absorption processes will undoubtedly be an important step toward the development of compound feeds.

* Corresponding author. UABC, PO Box 453, Ensenada BC 22860, Mexico. Tel.: +52 646 1745462x190; fax: +52 646 1745303.

E-mail address: viana@uabc.mx (M.T. Viana).

All cells require a continuous supply of amino acids (AA) to meet their metabolic needs. These AAs can be obtained by endocytosis by means of transport proteins or paracellular movement by carrier-independent passive diffusion. Amino acids can also be transported by ion gradient-independent carriers and by energy-dependent carriers coupled with ionic gradients (Ferraris and Ahearn, 1984). Transport systems are generally defined as proteins which recognize and transfer a selected group of substrates across the cellular membrane, either acting singly or in combination with other proteins (Matthews, 2000). Transport systems for AAs have been grouped into families according either to their required energy sources, kinetics of absorption, and/or substrate specificities, such as carriers for anionic (basic), cationic (acids), neutral (zwitterionic), and imino amino acids (Matthews, 2000).

Several *in vitro* and *in vivo* methods have been reported for measuring AA absorption and absorption, including the incubation of gut samples, everted intestine or plasma studies in radiolabeled medium, and nutrient absorption by cellular culture tissues (Ferraris and Ahearn, 1984; Buddington et al., 1987; Hidalgo and Li, 1996; Berge et al., 2004). Recently, in our laboratory, Rosas et al. (2008) used the everted intestine system to compare the absorption rates of AAs in various carnivores from freshwater and marine habitats. The innovation in this approach was the evaluation of AA intestinal absorption in a dynamic manner using the whole complex mixture of AAs from a commercial tryptone (Bacto™ Tryptone; Difco Cat. No. 211705), a pancreatic digest of casein consisting of a mixture of single AAs, filtered with an Amicon ultrafiltration cell (10 kDa cut-off). However, it is still necessary to develop more complex *in vitro* systems, which simulate not only absorption but also digestive processes, in order to generate more knowledge on the bioavailability of protein or AA supplements under the environmental conditions normally found, and then to use this information to formulate novel aquafeeds.

Thus the aim of this work was to evaluate AA *in vitro* uptake in the proximal intestinal region of the Pacific bluefin tuna (*T. orientalis*) using an AA pool obtained from fresh sardine hydrolyzed with a pancreatic enzyme extract from the bluefin tuna.

2. Materials and methods

2.1. Fish samples

Pacific bluefin tuna (15–18 kg bodyweight) were obtained from a commercial sea farm (Maricultura del Norte S de RL de CV, Ensenada BC, México). The pancreas tissue and/or intestinal section (12 fish) were removed and transported in iced and oxygenated Ringer solution (at 4 °C) for further investigation at the laboratory (1 h away) as recommended by Rosas et al. (2008) to avoid a decrease in cell viability.

The pancreas tissue was sliced and homogenized to obtain a pool sample from 12 fish, using one volume of pancreatic tissue per two volumes of iced saline solution (10% NaCl according to Viana and Raa, 1991). The homogenate was then centrifuged for 30 min at 3000 g at 4 °C and the supernatant was decanted. Alkaline protease activity was determined using azocasein prior to storing the supernatant at –80 °C until it was ready to be used for the hydrolysis of feed proteins.

The intestinal section just after the pyloric ceca (referred to as the proximal intestine) was sliced, placed in iced marine Ringer solution (117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄·7 H₂O, 2.5 mM CaCl₂; pH 7.4; Buddington et al., 1987), with an additional 150 mM NaCl to simulate the ion strength in marine organisms according to Berge et al. (2004). The intestine slices were utilized immediately upon arrival at the laboratory.

2.2. Experimental procedures

To simulate the digestion process in tuna, a protein hydrolyzate solution from sardine muscle was prepared. For this purpose, acid

digestion followed by an alkaline enzyme treatment was carried out using porcine pepsin followed by a bluefin tuna pancreatic homogenized enzyme pool as described above and outlined in Fig. 1.

The first stage of hydrolysis (acid step) was performed according to Alarcón et al. (2002). Here, an appropriate amount of muscle from sardine (*Sardinops sagax caerulea*) to yield 1.6 g of protein dry weight was homogenized, sieved through a 200-µm mesh, and dissolved with 180 mL of distilled water. The pH was adjusted to 2.0 with 1 M HCl solution and stirred for 30 min at 37 °C. To start the hydrolysis reaction, 20,000 U of porcine pepsin (Sigma P-7012) was added, at 12.5 U per mg protein, which is equivalent to the pepsin enzyme activity reported for the bluefin tuna (Matus-de-la-Parra et al., 2007). The solution was maintained at 37 °C and the activity was stopped after 1 h by adjusting the pH to 7.8 with 1 M NaOH. The alkaline step of hydrolysis was performed using the pH STAT system, as recommended by Navarrete-del-Toro and García-Carreño (2002). In summary, to start the reaction, a 10-mL enzymatic extract from the bluefin tuna pancreas was added (63.8 ± 0.5 U of alkaline protease activity). The reaction mixture was maintained for 2 h at 37 °C and the degree of hydrolysis (DH) was calculated according to Navarrete-del-Toro and García-Carreño (2002) as follows:

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

where *B* is the volume (in mL) of 0.1 mol L⁻¹ NaOH solution required to maintain the pH of the reaction mixture at 8.0; *N_B* corresponds to the normality of the titrant; *α* is the average dissociation degree of the *α*-amino groups; *M_p* is the quantity of protein (in g) present in the reaction mixture; and *h_{tot}* is the sum of individual AAs (mmol per gram protein) associated with the used protein source. The hydrolyzed solution was then centrifuged for 15 min at 3000 g at 4 °C and the supernatant was decanted and stored in an ice bath for immediate use.

2.3. Amino acid absorption analysis in proximal intestine

The technique using everted intestine is a modification of a system previously reported by Rosas et al. (2008). Briefly, a fragment of everted proximal intestine previously rinsed with iced marine Ringer solution was attached to a glass tube (9.5 mm i.d.) with an elastic bandage. The serous layer of the intestine (serosa) was then facing toward the inside of the tube, and the intestinal mucosa was facing outward so that it would come into direct contact with the hydrolyzed protein. The exposed area for absorption corresponded to 0.785 cm². The tube with the attached intestinal fragment was then placed in a specially designed flask with 25 mL volume capacity (Fig. 2). Oxygen was bubbled through a thin glass tube located to one side of the glass tube.

All the intestinal fragments were pre-incubated for 5 min at room temperature (22 °C) in marine Ringer solution constantly gassed with a mixture consisting of 95% O₂ and 5% CO₂. After being bubbled, the marine Ringer solution was exchanged for the experimental hydrolyzed solutions consisting of hydrolyzed sardine muscle made with the digestive enzymes from Pacific bluefin tuna, as previously described, at three different concentrations: 0.14 ± 0.01, 0.09 ± 0.01, and 0.06 ± 0.003 mg mL⁻¹. A control group was incubated in marine Ringer solution on its own, in order to correct for any amino acids released from the endogenous protein (Awati et al., 2009).

Each of the glass tubes with intestinal fragments attached was filled with 300 µL of marine Ringer solution and the tubes were submerged in flasks containing the hydrolyzed solutions. A 95/5 (%) O₂/CO₂ mixture was gassed through the flasks to keep the solution oxygenated. Individual samples of 30 µL were taken from each sampling tube at 0, 15, and 30 min and stored at –80 °C until analyzed. Samples taken at time 0 were considered to be the specific blank for each replicate. Individual samples were evaluated for AA content

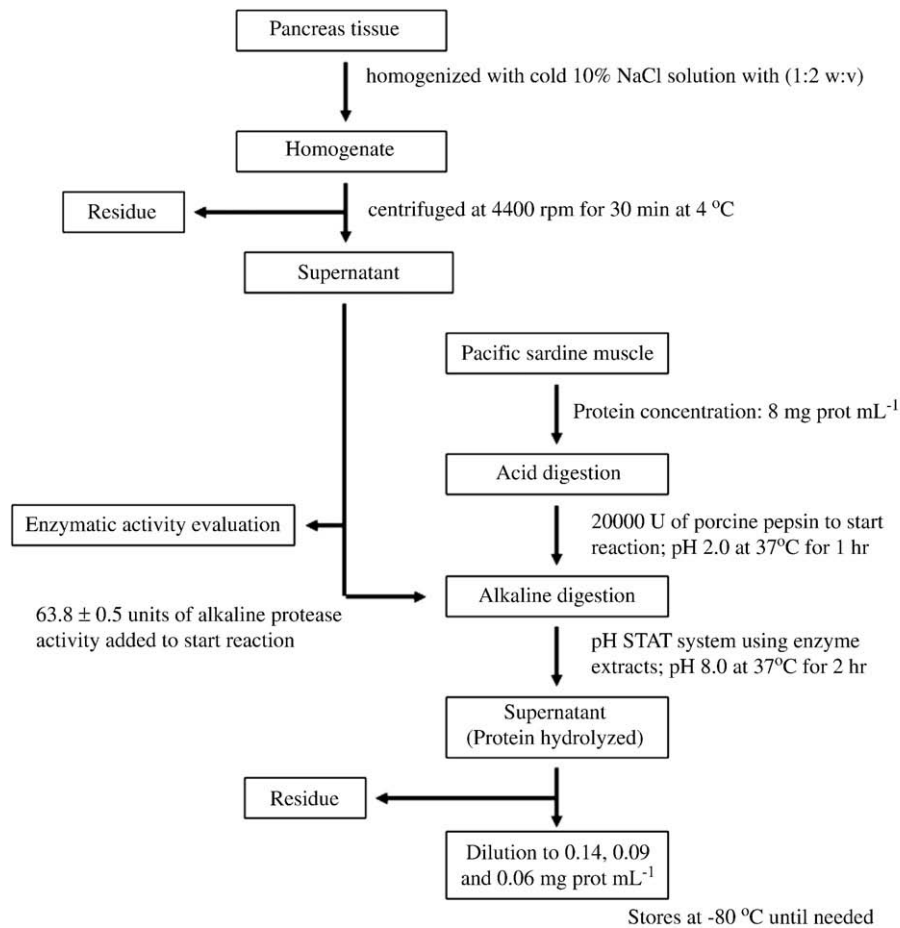


Fig. 1. Flow diagram for the preparation of hydrolyzed protein solutions.

using a Waters HPLC equipped with a fluorescence detector (Waters 474 series, Milford, MA). Samples were chromatographed through a reversed-phase column (2.1 × 200 mm; AminoQuant™ C-18, Hewlett-

Packard), using the water–acetonitrile gradient recommended by the Waters AccQ·Tag™ system. A fluorescence detector was set up for an excitation wavelength of 250 nm and emission wavelength of 395 nm. Analyses were run at a constant temperature of 37.5 °C. HPLC signal calibration and standard curves were obtained using an AA standard solution from 12.5 to 150 pmol of each AA. All analyses were conducted in triplicate.

Amino acid concentrations from the hydrolyzed sardine muscle solutions were measured in pmol mL^{-1} , and maximum specific absorption in pmol cm^{-2} . Absorption rates were calculated as $\text{pmol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ at intervals up to 30 min, as suggested by Rosas et al. (2008). Amino acid percentages were given either as the percentage of total AAs present in the hydrolyzed solution (AA initial profile); the percentage of AAs assimilated per mL in relation to the initial AA concentration from the different hydrolyzed solutions (given as % AA assimilated) and, finally, as the percentage of each AA in comparison to the total assimilated AAs at 30 min (AA final profile).

2.4. Statistical analysis

The maximum specific absorption for each AA was analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA). The absorption rate for each AA at different soluble protein concentrations (0.14, 0.09, and 0.06 mg mL^{-1}) and comparisons between AAs from the same polarity categories (cationic, anionic, or neutral) were analyzed using a two-way ANOVA by a split-plot model ($Y_{ijkl} = \mu + T_i + AA_{(ij)} + C_k + TC_{ik} + \varepsilon_{(ijk)l}$). This model is due to the different AAs included in each category (cationic, anionic, or neutral). When significant differences were detected between the mean values, a multiple comparison of means was performed using Tukey's test. Differences were considered

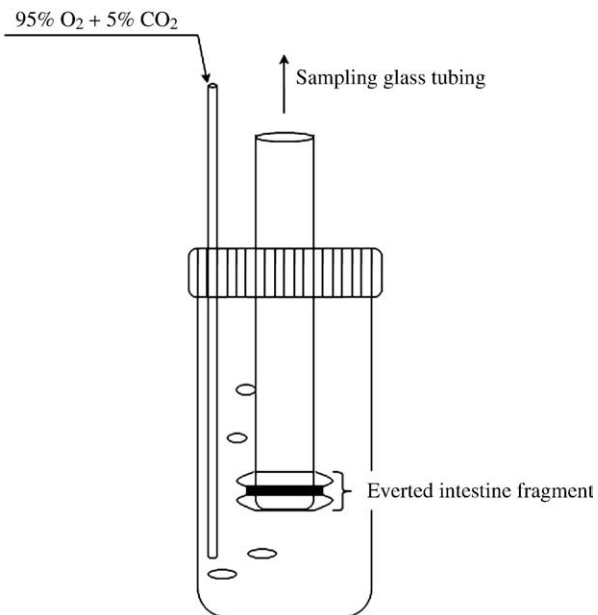


Fig. 2. Flask used to measure the absorption of amino acids by everted intestine where the fragment of proximal intestine was attached to a glass tube. An O_2/CO_2 mixture was bubbled through the lateral entrance (modified from Rosas et al., 2008).

significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SAS-GLM procedures (SAS Institute Inc, 2001).

3. Results

The degree of hydrolysis (DH) from the muscle protein showed an exponential trend during the first 90 min, and then an asymptotic development was followed up to a total of 19.4% DH at 120 min reaction time (Fig. 3).

The essential and non-essential amino acids (EAAs and NEAAs, respectively) were differentially assimilated in relation to their original concentrations in the experimental hydrolyzed solution. The NEAAs were preferentially assimilated in comparison with the EAAs (Table 1) for the solutions containing 0.06 and 0.09 mg soluble protein mL^{-1} . However, this gap between EAAs and NEAAs absorption (42.2% and 57.8% from the total assimilated AAs) was slightly lower when using the higher concentration of soluble protein (0.14 mg mL^{-1}).

The AAs with the highest specific absorption were the NEAAs: Ala, Glu, and Gly (517–793, 479–850, and 479–850 pmol cm^{-2} , respectively) within the three different hydrolyzed solution concentrations. Arg, Thr, Lys, and Leu were the EAAs that had the highest concentrations, with no significant differences among them.

Although the initial concentration of Tau in the experimental solutions was rather low (536 pmol mL^{-1} at $0.14 \text{ mg soluble protein per mL}$), this amino acid showed the highest specific absorption in all cases (from 3102 to $3958 \text{ pmol cm}^{-2}$).

According the two-way analysis of variance no interaction was found between the different AAs and concentrations. The concentrations of hydrolyzed protein positively affected the amino acid absorption rate for Arg, Glu, His, Lys, Thr, Leu, Ala and Tau, as shown in Table 2. While the initial concentrations of Lys and Arg in the experimental solutions differed, the absorption rates were similar for both AAs (Table 2). The absorption rate for Arg and Lys was affected by the hydrolyzed solution concentrations, being higher for the higher hydrolyzed protein solution at 0.14 mg mL^{-1} (12.1 and $11.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, for Arg and Lys, respectively), compared with the solution at 0.06 mg mL^{-1} (7.0 and $6.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ for Arg and Lys, respectively). Moreover, the absorption of the anionic amino acid Glu was, in all cases, twice that observed for Asp (26.1 – 18.4 compared with 10.1 – $6.3 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectively). However, the absorption rate of Asp was positively affected by the protein concentration (Table 2). For the neutral AAs, both EAAs and NEAAs, the absorption rate was proportionally affected by the concentration, especially for Thr, Leu and Ala. The neutral AAs assimilated in the greatest quantities were Ala and Gly, which were significantly similar in all three protein concentrations. The absorption rates for Tyr, Phe,

Met, and Val were lower, being the least efficiently assimilated in all experimental solutions. It is important to mention that even at time 0, the concentrations of Met, Phe, and Tyr were low (348 , 381 , and 208 nmol mL^{-1} , respectively).

The only amino acid of the imino type, Pro, did not show significant differences in absorption at different protein concentrations.

4. Discussion

The everted intestine system described here is a further contribution on the approach described previously by Rosas et al. (2008), in which the uptake of amino acids from a commercial pancreatic hydrolyzate of casein was compared for three different species of carnivorous fish. In the present work, fresh sardine muscle hydrolyzed with alkaline enzymes from the pancreas of a bluefin tuna was tested. Acid digestion was also tested, but in this case, porcine pepsin was used to simulate this step, imitating a similar activity (in units per mg) as previously found for the Pacific bluefin tuna (Matus-de-la-Parra et al., 2007). The present work is one of the first to show the use of this gastrointestinal system to estimate the AA absorption rates from a natural pool of protein, such as hydrolyzed sardine tissue, by the bluefin tuna. The opportunity to use the natural diet together with their endogenous digestive enzymes of the species studied will further make this kind of assay more realistic; in addition, enzymes that are present in the epithelium but are rarely considered in digestibility tests are also included, for example aminopeptidases, alkaline phosphatases, and others that are involved in the active transport of peptides and amino acids (Ferraris and Ahearn, 1984). The bluefin tuna intestine used here came from a commercial culture fed with fresh sardine and therefore the enzymes produced naturally should be adapted to this type of food. It has been demonstrated that when any animal changes its diet it undergoes an acclimatization period where the metabolism adapts in order to improve digestion and uptake.

In the present study, the sardine muscle constituted the AA source after a degree of hydrolysis close to 20% using pepsin digestion prior to an alkaline digestion with pancreatic enzymes from the bluefin tuna. This hydrolysis of 20% is low compared to earlier reports (72.9 to 82.8%) made with a bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) enzyme extract (Carter et al., 1999), the incubation time was 12 h instead of 2 h used in the present work. Even if a 2 h digestion cannot be considered to mimic a real process it will be of importance for further studies to find out a more reliable overall digestion model.

The AA profile obtained was different from that obtained in the AA profile from tryptone (Bacto™ Tryptone; Difco, Cat. No. 211705), a pancreatic digest of casein previously used by Rosas et al. (2008). Nevertheless, as both studies used the everted intestine of bluefin tuna under similar physiological conditions, it was possible to appreciate any differences between the absorption rates from the different AAs. These could be associated with a differential AA bioavailability due to differences in the proportions present in both protein solutions, promoting differences in the AA competition for transporters. This could enhance the competition between certain AAs, resulting in positive or negative interactions (Berge et al., 1999, 2004).

The use of tryptone as the AA source for the absorption test using the everted intestine favors the absorption of EAAs over NEAAs (Rosas et al., 2008). Conversely, in the present work, the NEAAs were assimilated at double the rate observed for the EAAs. However, of those NEAAs, Ala, Glu, and Gly accounted for more than 40% of the total assimilated AAs in all samples at the three different protein concentrations. In fact, Glu and Gly were assimilated at 129.8% and 137%, respectively, in relation to the initial concentrations present in the experimental solution containing $0.06 \text{ mg protein mL}^{-1}$.

Rosas et al. (2008) found that the absorption of glucogenic AAs such as Glu and Gly, was somehow facilitated under stress conditions such as the absence of oxygen. Although the results presented here do not mean that anoxic conditions were prevailing, as this possibility

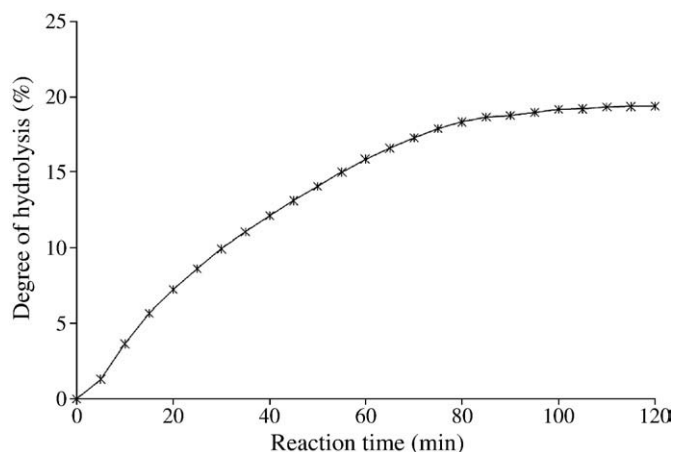


Fig. 3. Degree of hydrolysis of sardine muscle using the pH STAT system with a reaction time of 2 h.

Table 1
Maximum specific absorption (30 min) \pm SD from the amino acid (AA) solution (hydrolyzed sardine muscle) at three different concentrations of soluble protein (0.14, 0.09, and 0.06 mg soluble protein per mL), using proximal everted intestine from the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). The initial AA concentration reported is from the solution with 0.14 mg soluble protein mL⁻¹ only.

Amino acid	Initial AA concentration (pmol mL ⁻¹)	AA initial profile ¹ (%)	0.14 mg mL ⁻¹			0.09 mg mL ⁻¹			0.06 mg mL ⁻¹		
			Max average absorption \pm SD ² (pmol cm ⁻²)	AA final profile ³ (%)	Percent of each AA assimilated ⁴ (%)	Max average absorption \pm SD ² (pmol cm ⁻²)	AA final profile ³ (%)	Percent of each AA assimilated ⁴ (%)	Max average absorption \pm SD ² (pmol cm ⁻²)	AA final profile ³ (%)	Percent of each AA assimilated ⁴ (%)
EAA											
His	775.9	5.4	156.3 \pm 34.1 ^d	2.8	20.1	252.7 \pm 54.0 ^{bcd}	4.7	41.1	117.2 \pm 11.1 ^d	3.3	53.1
Arg	601.2	4.2	382.5 \pm 48.0 ^b	6.8	63.6	285.1 \pm 55.0 ^{bcd}	5.3	61.4	209.7 \pm 45.4 ^{cd}	5.9	102.2
Thr	1009.2	7.0	400.3 \pm 4.7 ^b	7.1	39.7	399.5 \pm 218.8 ^b	7.5	50.5	167.2 \pm 22.9 ^{cd}	4.7	36.0
Val	930.9	6.5	122.2 \pm 25.2 ^d	2.2	13.1	67.7 \pm 15.7 ^d	1.3	9.0	59.8 \pm 0.6 ^d	1.7	12.8
Met	515.6	3.6	133.7 \pm 25.1 ^d	2.4	25.9	122.6 \pm 25.3 ^{cd}	2.3	30.9	87.8 \pm 5.7 ^d	2.5	35.2
Lys	1723.3	12.0	347.8 \pm 15.3 ^b	6.2	20.2	220.4 \pm 9.4 ^{bcd}	4.1	16.2	192.3 \pm 52.6 ^d	5.4	17.2
Ile	877.6	6.1	237.7 \pm 34.8 ^{bc}	4.2	27.1	136.7 \pm 28.6 ^{bcd}	2.6	19.5	105.8 \pm 11.7 ^d	3.0	26.3
Leu	1351.0	9.4	403.6 \pm 112.0 ^b	7.2	29.9	220.2 \pm 55.0 ^{bcd}	4.1	20.7	182.5 \pm 26.2 ^d	5.1	28.1
Phe	564.4	3.9	182.5 \pm 54.3 ^{cd}	3.3	32.2	100.5 \pm 24.5 ^d	1.9	24.2	90.4 \pm 8.6 ^d	2.5	32.7
Subtotal	8349.1	57.9		42.2			33.8			34.1	
NEAA											
Asp	1037.6	7.2	303.9 \pm 13.3 ^{bc}	5.4	29.3	238.8 \pm 33.8 ^{bcd}	4.5	26.8	188.8 \pm 22.7 ^{cd}	5.3	31.9
Ser	724.5	5.0	400.1 \pm 22.8 ^b	7.1	55.2	420.8 \pm 98.5 ^b	7.9	68.4	310.6 \pm 46.1 ^b	8.7	81.9
Glu	1132.6	7.9	624.6 \pm 41.3 ^a	11.1	55.2	782.6 \pm 40.5 ^a	14.6	89.4	550.6 \pm 115.3 ^a	15.4	129.8
Gly	770.9	5.0	607.2 \pm 74.2 ^a	10.8	78.8	850.4 \pm 88.4 ^a	15.9	137.7	479.0 \pm 47.8 ^a	13.4	137.0
Ala	1485.7	10.3	733.6 \pm 42.5 ^a	13.1	49.4	793.9 \pm 54.5 ^a	14.8	66.7	517.2 \pm 116.8 ^a	14.5	67.0
Pro	604.9	4.2	379.1 \pm 27.9 ^b	6.8	62.7	357.0 \pm 58.2 ^{bc}	6.7	92.6	222.2 \pm 39.8 ^c	6.2	91.8
Tyr	309.0	2.1	187.8 \pm 38.5 ^{cd}	3.4	60.8	104.4 \pm 24.0 ^d	2.0	47.2	92.2 \pm 0.9 ^d	2.6	77.8
Subtotal	6065.0	42.1		57.8			66.4			66.1	
Others											
Tau	536.14		3102.1 \pm 62.1		1593.7	3958.5 \pm 121.8		1077.2	3650.5 \pm 221.9		1000.9

Values within the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Amino acid percentage from the total amino acids in the protein hydrolyzed with 0.14 mg soluble protein per mL⁻¹.

² Maximum concentration of specific amino acid assimilated inside the everted intestine after 30 min. Values shown are means ($n = 3$) \pm standard deviation.

³ Amino acid percentage from the total assimilated amino acids in 30 min.

⁴ Percentage absorption relative to initial concentration in the different hydrolyzed solutions.

Table 2

Average absorption rates (30 min) \pm SD from AA solution (hydrolyzed sardine muscle) at three different concentrations of soluble protein (0.14, 0.09, and 0.06 mg soluble protein mL⁻¹), using the proximal everted intestine from Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). Amino acids are grouped according to their polarity.

Amino acid	0.14 mg mL ⁻¹ (pmol cm ⁻² min ⁻¹)	0.09 mg mL ⁻¹ (pmol cm ⁻² min ⁻¹)	0.06 mg mL ⁻¹ (pmol cm ⁻² min ⁻¹)
Cationic amino acids			
Arg	13.6 \pm 0.6 ^{a,A}	9.5 \pm 1.8 ^{AB}	7.0 \pm 1.5 ^B
His	5.9 \pm 0.4 ^{b,AB}	8.4 \pm 1.8 ^A	3.9 \pm 0.4 ^B
Lys	11.6 \pm 0.5 ^{a,A}	7.3 \pm 0.3 ^B	6.4 \pm 1.8 ^B
Anionic amino acids			
Asp	10.1 \pm 0.4 ^b	8.0 \pm 1.1 ^b	6.3 \pm 0.8 ^b
Glu	20.8 \pm 1.4 ^{a,AB}	26.1 \pm 1.4 ^{a,A}	18.4 \pm 3.8 ^{a,B}
Neutral amino acids			
Essential			
Thr	13.4 \pm 0.2 ^{bcd,e,A}	13.3 \pm 7.3 ^{b,A}	5.6 \pm 0.8 ^{bc,B}
Val	4.1 \pm 0.8 ^e	2.3 \pm 0.5 ^c	2.0 \pm 0.0 ^c
Met	4.5 \pm 0.8 ^e	4.1 \pm 0.8 ^c	2.9 \pm 0.2 ^c
Ile	7.9 \pm 1.2 ^{cde}	4.6 \pm 0.9 ^c	3.5 \pm 0.4 ^{bc}
Leu	13.5 \pm 3.7 ^{bcd,A}	7.3 \pm 1.8 ^{bc,B}	6.1 \pm 0.9 ^{bc,B}
Phe	6.1 \pm 1.8 ^e	3.4 \pm 0.8 ^c	3.0 \pm 0.3 ^c
Non-essential			
Ser	13.3 \pm 0.8 ^{bcd,e}	14.0 \pm 3.3 ^b	10.4 \pm 1.5 ^{ab}
Gly	21.5 \pm 1.6 ^{ab,B}	28.4 \pm 2.9 ^{a,A}	15.9 \pm 1.6 ^{a,B}
Ala	24.5 \pm 1.4 ^{a,A}	26.5 \pm 1.8 ^{a,A}	17.2 \pm 3.9 ^{a,B}
Tyr	6.3 \pm 1.3 ^{de}	3.5 \pm 0.8 ^c	3.1 \pm 0.0 ^c
Imino amino acids			
Pro	12.6 \pm 0.9	11.9 \pm 1.9	7.4 \pm 1.3
Others			
Tau	103.4 \pm 2.1 ^B	131.9 \pm 4.1 ^A	121.7 \pm 7.4 ^{AB}

Values within the same columns (lower-case) and row (upper-case) for each group according to the amino acid polarity with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Values shown are means ($n = 3$) \pm standard deviation.

can be ruled out due to the experimental design, it is likely that the energy requirement of the cells (Wu, 1998) favored the absorption of glucogenic amino acids.

The dietary amino acids Gln, Glu, and Asp, as well as the arterial Gln, are the principal fuels in the intestinal mucosa, responsible for providing the necessary energy for the ATP-dependent metabolic processes (Wu, 1998). It is estimated that ATP molecules are generated from the AA oxidation of Ala (15 ATP/Ala), Glu (27 ATP/Glu), and Pro (30 ATP/Pro), similar to those originating from certain carbohydrate oxidations such as those of pyruvate (15 ATP/Pyruvate) and glucose (36 ATP/Glucose) (Hochachka and Somero, 2002). Ala is the most important nitrogenous product; through the alanine transaminase the transfer from alanine to α -ketoglutarate is catalyzed, and the products of this reversible transamination reaction are pyruvate and glutamate. Moreover, Ala plays an important role as an N transporter of several dietary AAs to extra-intestinal tissues (Wu, 1998), explaining the high absorption rate of Ala in the present study.

The absorption observed in the present study does not take into account the absorption via passive routes (including the paracellular transport) as well as the action of mediated transporters. In salmon, it has been reported that passive diffusion is particularly important for Pro (imino acid), Asp (acidic), Met and Leu (neutral) (Bakke-McKellep et al., 2000). In the present study, passive diffusion was probably important for Asp and Pro, since their absorption was proportionally affected by the higher protein solution concentration. This kind of absorption is not through a cellular membrane but uses a paracellular route or endocytosis (Matthews, 2000).

Taurine (Tau, 2-amonietaanosulfonic acid) is an AA analogue to β -alanine, which is present in high quantities as a free AA in most animal tissues. Tau is synthesized from Cys through several chemical reactions, principally with the aid of L-cysteinsulfinate decarboxylase (CSD) (Yokoyama et al. 1997). This enzyme activity varies with each species, and it has been documented that in the yellowtail, bluefin

tuna, and skipjack, the activity is not present or is very low (Yokoyama et al., 2001). However, in spite of the low activity reported in these fish, the Tau concentration in tissue was high and therefore another origin is assumed. In other vertebrate animals, Tau is synthesized through routes such as cysteate decarboxylase, cysteine dioxygenase, cysteamine dioxygenase, and from inorganic sulfate (Goto et al., 2003). When the route via CSD is depressed or absent, then the dietary intake of Tau becomes important. According to Sharafuddin and Nassar (1993) Tau is transported through two distinct transport mechanisms; a linear non-carrier mediated component and a saturable carrier mediated component, with almost equal contribution from each. The mediated component was found to be largely Na⁺-dependent and exhibited marked inhibition by β-alanine and structurally related sulfur AAs. Zarate and Bradley (2007) reported a high degree of similarity for the Tau transporter in tilapia, carp, and salmon. The activity of this transporter in the bluefin tuna is expected to be relatively high due to the high concentration of Tau found in the assimilated sample compared with the Tau present in the experimental solution. Thus, the high concentrations of Tau may arise from depots inside the cells and would not necessarily originate from the hydrolyzate or Cys transformation. Even if the bluefin tuna did possess the CSD route, this is only present in the liver and therefore would not be detected by the everted absorption system.

The results showed that different chemical or physiological conditions can be efficiently evaluated, and certain AAs, including Arg and Lys, have more affinity to the cationic transporters than His does. The preferential uptake of certain AAs or crosswise inhibition can be evaluated in this system by adding individual AAs to the hydrolyzate. By using ¹³C-labeled AA supplementation and analyzing for the isotopic composition of individual AAs (McCullagh et al., 2008), even the deamination and transamination processes occurring in the intestine could be studied using this model.

As the opportunities for carrying out classical digestibility experiments with large, fast-swimming fish are extremely limited and, at the same time, the development of alternative diets to substitute the fresh sardine and mackerel is urgently needed in order to improve the ecological and economic sustainability of tuna farming, this model for digestion and absorption may be of great use.

The system uses pancreatic and intestinal tissue from fish that have previously been adapted to the diet under study. This will be also helpful in studying the fate of other nutrients such as carbohydrates, lipids, feed additives (e.g., binders, vitamins, or minerals). Therefore, the pH STAT system (Navarrete-del-Toro and García-Carreño, 2002) coupled with the techniques described by Rosas et al. (2008) demonstrate great potential for the development of a dynamic gastrointestinal system.

This is a new approach to estimating the AA absorption of proteins and several problems need to be overcome, like considering a realistic overall digestion (higher than 20%); defining a proper incubation volume to estimate the AA absorption efficiency; estimation of differences in absorption along the whole length of the intestine, evaluating the effects of additives on absorption, and others. In particular, a flask with a volume of 25 mL to hold the exposed area (2.78 cm²) was used; therefore, the AA absorption efficiency from this given volume could result in a low efficiency. Thus, a better approach needs to be evaluated to mimic a more real digestibility.

Moreover, through the use of this system it will also be possible to test absorption efficiency under different conditions, such as stress either through environmental factors such as differences in salinity, temperature, oxygenation, among others, or physiological stress caused by factors such as toxins, inhibitors, illness, undernourishment, etc.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CoNaCyT), Project C01-45785 and UABC Project 403/5/C/

8/11. We thank Maricultura del Norte SA de CV and Bajamachi SV de RL for their kind donation of fish. Emmanuel Martínez-Montaño and Emyr Peña thank CONACyT for their fellowships for graduate studies. The authors thank Ms. Nancy Boston for her editorial work in English.

References

- Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz, M., 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1–8.
- Awati, A., Rutherford, S.M., Plugge, W., Reynolds, G.W., Marrant, H., Kies, A.K., Moughan, P.J., 2009. Ussing chamber results for amino acid absorption of protein hydrolysates in porcine jejunum must be corrected for endogenous protein. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1857–1861.
- Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, Å., Buddington, R.K., 2000. Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 22, 33–44.
- Berge, G.E., Bakke-McKellep, A.M., Lied, E., 1999. *In vitro* uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 179, 181–193.
- Berge, G.E., Goodman, M., Espe, M., Lied, E., 2004. Intestinal absorption of amino acids in fish: kinetics and interaction of *in vitro* uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 229, 265–273.
- Buddington, R.K., Chen, J.W., Diamond, J.M., 1987. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393, 261–281.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 180, 345–358.
- Carter, C.G., Kaushik, S.J., Cho, C.Y., 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: *in vitro* digestibility. *Aquaculture* 179, 57–70.
- FAO, 2007. State of Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome.
- Ferraris, P.B., Ahearn, A.G., 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 77, 397–413.
- Goto, T., Matsumoto, T., Murakami, S., Takagi, S., Hasumi, F., 2003. Conversion of cysteate into taurine in liver of fish. *Fish. Sci.* 69, 216–218.
- Hidalgo, I.J., Li, J., 1996. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 22, 53–66.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*, 1st edn. Oxford University Press, New York.
- Matthews, J.C., 2000. Amino acids and peptide transport systems. In: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 3–20.
- Matus-de-la-Parra, A., Rosas, A., Lazo, J.P., Viana, M.T., 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 223–231.
- McCullagh, J.S.O., Gaye-Siessegger, J., Focken, U., 2008. Direct determination of δ¹³C of individual amino acids by LC-IRMS in nutritional studies: first data on the effect of dietary non-essential amino acid profile on the isotopic signature of individual amino acids in fish. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1817–1822.
- Navarrete-del-Toro, M.A., García-Carreño, F.L., 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. In: Wrolstad, R.E., Decker, E.A., Schwartz, S.J., Sporns, P. (Eds.), *Handbook of Food Analytical Chemistry. Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*, Vol. 1. John Wiley and Sons, pp. B2.2.1–B2.2.14.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405 (29), 1017–1024.
- Rosas, A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Shimada, A., D'Abramo, L.R., Viana, M.T., 2008. Comparative intestinal absorption of amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture Nutr.* 14 (6), 481–189.
- SAS Institute Inc, 2001. SAS/STAT®. SAS Institute Inc, Cary North Carolina, USA.
- Sharafuddin, M., Nassar, C.F., 1993. The components of taurine transport across the rat small intestine. A kinetic study. *Amino Acids* 5 (1), 77–89.
- Sylvia, P., 2007. Current Status of Bluefin Tuna Farming in North America. World Aquaculture Society.
- Viana, M.T., Raa, J., 1991. Lysozyme-like enzyme from the scallop *Chlamys islandica*. *Ciencias Marinas* 18, 93–107.
- Wilson, R.P., 2002. Amino acids and proteins. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, CA, pp. 143–179.
- Wu, G., 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.* 128, 1249–1252.
- Yokoyama, M., Kaneniwa, M., Sakaguchi, M., 1997. Metabolites of L-[35S] cysteine injected into the peritoneal cavity of rainbow trout. *Fish. Sci.* 63, 799–801.
- Yokoyama, M., Takeuchi, T., Park, G.S., Nakazoe, J., 2001. Hepatic cysteine sulphinate decarboxylase activity in fish. *Aquaculture Res.* 32 (Suppl. 1), 216–220.
- Zarate, J.M., Bradley, T.M., 2007. Molecular cloning and characterization of the taurine transporter of Atlantic salmon. *Aquaculture* 273, 209–217.
- Zertuche-González, J.A., Sosa-Nishizaki, O., Vaca-Rodríguez, J.G., del Moral Simanek, R., Yarish, C., Costa-Pierce, B.A., 2008. Marine Science Assessment of Capture-Based Tuna (*Thunnus orientalis*) Aquaculture in the Ensenada Region of Northern Baja California. Mexico, Final Report of the Binational Scientific Team to the Packard Foundation, Los Altos, CA.

3. CAPÍTULO II



In vitro amino acid absorption using hydrolysed sardine muscle or soybean meal at different intestinal regions of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*)

E. MARTÍNEZ-MONTAÑO¹, E. PEÑA¹ & M.T. VIANA²

¹ Programa de Maestría y Doctorado en Oceanografía Costera, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, BC, México; ² Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Ensenada, BC, México

Abstract

The amino acid (AA) absorption along the intestinal tract of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) was evaluated using two hydrolysed protein sources (fresh sardine muscle and soybean meal) with the everted intestine technique. Pork pepsin and pancreatic enzyme extract from the bluefin tuna were used to hydrolyse the protein from fresh sardine (FSH) and soybean meal (SMH) under optimal bluefin tuna fish physiological conditions. Both of the hydrolysate solutions were tested within three intestinal sections from the bluefin tuna. The everted intestinal fractions immersed in the hydrolysate solutions were sampled at different times to analyse for AA and absorption rate calculations. Fresh sardine and SMH contained greater amounts of essential amino acids (EAA) than those of non-essential amino acids (NEAA); however, the profiles of AA absorbed showed higher absorption of NEAA in both cases. Using a similar concentration solution, the absorption rates within the intestinal fractions showed a preferential absorption in the proximal and distal regions for Arg and His when FSH was used. However, the absorption rates for Lys resulted in a decreasing proximal-to-distal gradient between the different intestinal regions for FSH and SMH. The possibility of a catabolic role of certain AAs in the enterocytes being able to explain the differences in absorption is discussed.

KEY WORDS: amino acid absorption, bluefin tuna, everted intestine, hydrolysed protein, hydrolysed soybean meal, protein digestibility

Received 25 July 2010, accepted 21 December 2010

Correspondence: Maria Teresa Viana, UABC, PO Box 453, Ensenada, Baja California 22860, México. E-mail: viana@uabc.edu.mx

Introduction

Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) mariculture, which is one of the most valuable fishery industries worldwide, is highly dependent on fresh sardine as the food source despite its low feed conversion efficiency. According to Zertuche-González *et al.* (2008), 17 kg of fresh sardine is needed to produce one kilogram of tuna, with adverse effects both on animal productivity (and profitability) and on the environment, because of the large amounts of waste products that need to be disposed of. Thus, it is important to reduce the amount of sardine used as food for tuna by formulating novel diets and to diversify the protein and lipid sources to maximize the growth process through an increase in feed conversion efficiency.

Several strategies have been proposed to formulate feeds for the bluefin tuna, such as using extruded feeds and pellets enclosed in sausage skins made of pig intestine, cellulose, collagen or other membranes (Charat & Valdez 2008) as well as dry feed pellets (Clarke *et al.* 1997), as well as attempts to develop *in vitro* techniques (Carter *et al.* 1998, 1999). However, none of these reduces the use of sardine and other small pelagic fish or generates enough information regarding protein digestion and absorption to better mimic their nutritional needs.

One of the restrictions to performing research into the nutritional requirements of the bluefin tuna is owing to the difficulty in carrying out *in vivo* research in the sea culture cages, because it is necessary to include several treatments and the appropriate number of replications. Therefore, *in vitro* methodology to simulate the digestive physiological processes is important and has recently been adapted in our laboratory through the use of the everted intestine technique, investigating digestion with endogenous digestive pancreatic enzymes in a dynamic system (Martínez-Montaña *et al.* 2010), a mixture previously digested by pork pepsin under

similar activity conditions observed in the bluefin tuna and described by Matus-de-la-Parra *et al.* (2007). In general, *in vitro* techniques applied to digestion and digestibility studies either do not use endogenous enzymes or do not use the appropriate amounts; in addition, *in vitro* digestibility studies do not usually measure nutrient absorption process where only the bioavailability of nutrients is reported. Using this approach, Rosas *et al.* (2008) proposed an everted intestine system at the proximal intestinal fraction to compare amino acid (AA) kinetic absorption from the complete AA content of a commercial hydrolysed casein (Bacto™ Tryptone; Difco, Lawrence, KS, USA) by three carnivorous fish: Pacific bluefin tuna, totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). With this system, it was possible to find differences in AA kinetic absorption between freshwater and marine fish and also to measure the effect of respiratory stress on preferential AA absorption (Rosas *et al.* 2008). Recently, Martínez-Montaña *et al.* (2010) modified this *in vitro* gastrointestinal system in tandem with the pH-stat method (Navarrete-del-Toro & García-Carreño 2002) to digest fresh sardine using bluefin tuna endogenous enzyme extracts after pork pepsin digestion under optimal physiological conditions of activity (units), temperature and pH to mimic a naturally hydrolysed solution. Moreover, it was demonstrated the cell viability during 6 h without a significant change using MTT as indicator by incubating the intestinal fraction in Ringer solution under bubbling with carbogen gas (95% and 5% oxygen and carbon dioxide, respectively). Despite this being a promising technique, only the proximal intestinal region was tested and it is still necessary to assess different protein sources.

Several *in vivo* and *in vitro* studies have been undertaken in salmonids and other carnivorous fish to evaluate AA absorption along the intestinal tract using ¹⁴C-labelled AAs (Ferraris & Ahearn 1984; Buddington *et al.* 1987; Berge *et al.* 1999; Bakke-McKellep *et al.* 2000). In these studies, a declining nutrient absorption rate from the proximal to the distal region was observed. However, Bakke-McKellep *et al.* (2000) hypothesized that high-affinity AA transporters are minor contributors to the absorption of the high dietary loads of protein needed for carnivorous fish such as salmon.

Intestinal absorption of AA involves several mechanisms such as carrier-independent diffusion, facilitated transport and active transport (Mailliard *et al.* 1995). Facilitated and active transports are carried out by a large number of protein transporters that are more or less specific to different classes of AAs on the brush-border membrane of the enterocytes (Mailliard *et al.* 1995; Matthews 2000). These AA transport systems have been grouped into families according to their

required energy source, kinetics of absorption or substrate specificities, such as carriers for anionic (basic), cationic (acid), neutral and imino AAs (Matthews 2000).

The bluefin tuna is a carnivorous fish characterized by a well-developed stomach and high pepsin activity. The absorptive area consists of a complex area composed of pyloric ceca where large amounts of enzymes are delivered and AAs are initially absorbed, followed by a short intestine with rather undifferentiated intestinal regions. The pyloric ceca is a complicated area composed by numerous tiny tubes (<2.5 mm diameter) infiltrated into the pancreatic mass, whereas the proximate intestine is a well-defined area that can be easily sliced to measure the AA absorption. An unusual characteristic of the tuna, compared with other fish, is its high metabolic rate and heterothermic corporal properties. This allows them to survive in a wide range of temperatures without reducing their physiological efficiency. Stevens & McLeese (1984) reported an average temperature of 27 and 28 °C within the pyloric ceca and stomach, respectively, during the digestive process, when the ambient water temperature was 13 °C. This ability, together with the large amount of digestive enzymes secreted along the whole intestinal surface plus the extended absorptive area provided by the pyloric ceca (Stevens & McLeese 1984), makes the bluefin tuna an interesting fish to study with regard to its physiological digestive processes and the formulation of complete diets.

The key to a successful diet protein formulation is not only to compile the right AA profile to match the dietary requirements of the fish but also to combine several different protein sources capable of being properly digested to be available for absorption, so as to reduce the reliance on fish protein sources. There have been many studies on fish meal substitution *in vivo*, which have not always been successful (Francis *et al.* 2001; Krogdahl *et al.* 2003; Urán *et al.* 2008). The reported differences in protein digestion could be attributable to overall enzyme expression and the conditions that need to be fulfilled to digest a given protein source. In spite of these results, more research needs to be conducted – for instance, a study of AA availability from the protein content of formulated feeds using a reliable *in vitro* technique when *in vivo* experiments are not feasible like with the bluefin tuna or any other large marine fish cultured in sea cages. Therefore, it is important to compare the results obtained with this technique using different protein sources.

The aim of this work was to evaluate the AA absorption along the intestinal tract of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) using two different hydrolysed protein sources

(fresh sardine muscle and soybean meal) with the everted intestinal system. Pancreatic enzyme extracts from the bluefin tuna and porcine pepsin were used to hydrolyse the protein source material.

Materials and methods

Fish sample and extraction of digestive enzymes

Pacific bluefin tuna (20–30 kg bodyweight) fasted for 24 h were obtained from a commercial sea farm (Bajamachi S de RL de CV, Ensenada, BC, México). The whole intestines from the pyloric ceca region up to the rectum (from 18 fish) was removed and placed in iced marine Ringer solution (117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄·7 H₂O and 2.5 mM CaCl₂; pH 7.4; Buddington *et al.* 1987) with an additional 150 mM NaCl to correct the ionic strength for marine organisms. The intestinal samples were then transported into the laboratory 2 h away while bubbling with carbogen gas (95–5% O₂ and CO₂, respectively) inside the flask to avoid a decrease in tissue viability, as recommended by Rosas *et al.* (2008). The tetrazolium salts (MTT) were used as indicator of cell viability on the intestinal segments during the whole experiment (Holst & Oredsson 2005).

Pancreas tissue from five fish was sliced and homogenized, using one volume of pancreatic tissue per two volumes of iced saline solution (10% NaCl, according to the method of Viana & Raa 1991). The homogenate was then centrifuged for 30 min at 3000 g at 4 °C, and the supernatant was decanted. Alkaline protease activity was determined using azocasein prior to storing the supernatant at –80 °C until it was used for hydrolysis of the feed proteins.

Experimental procedure

To simulate the digestion process in tuna, two protein hydrolysates from sardine (*Sardinops sagax caerulea*) muscle obtained from local fisheries and soybean meal (PADSA, Mexico) were prepared. Both protein sources were digested in a two-step process: an acidic digestion using porcine pepsin followed by an alkaline enzyme treatment with a bluefin tuna homogenized pancreatic enzyme extract, as described by Martínez-Montaña *et al.* (2010).

The first stage of hydrolysis (acidic) was performed according to Alarcón *et al.* (2002). In brief, an appropriate amount of each protein source was chosen so as to achieve a final protein concentration of 0.8 mg of crude protein per mL. Both sources were sieved (through a 200-µm mesh) and

dissolved in 180 mL distilled water in a solution adjusted to pH 2.0 with 1 M HCl solution and stirred for 30 min at 37 °C. To start the protein hydrolysis, 20 000 U of porcine pepsin (Sigma P-7012) was added at 12.5 U per mg protein, which is equivalent to the pepsin enzyme activity reported for the bluefin tuna (Matus-de-la-Parra *et al.* 2007). The solution was maintained at 37 °C, and the activity stopped after 1 h by adjusting the pH to 8.0 with 1 M NaOH solution. The alkaline step of the hydrolysis was performed employing the pH-stat system, as recommended by Navarrete-del-Toro & García-Carreño (2002). In summary, to start the reaction, 10 mL of enzymatic pancreatic extract from bluefin tuna was added (63.8 ± 0.5 U of alkaline protease activity). The reaction mixtures were maintained for 2 h at pH 8.0 and 37 °C. The hydrolysed protein solutions from fresh sardine muscle (FSH) and soybean meal (SMH) were centrifuged for 15 min at 3000 g and 4 °C. Finally, the supernatants consisting in a crude hydrolysates without separation of single amino acids were decanted and stored in an ice bath for immediate use.

Amino acid absorption analysis in different intestinal regions

The technique using everted intestine was previously described by Rosas *et al.* (2008). Fresh whole intestine of bluefin tuna fish was divided into three regions, identified as proximal, medial and distal. The proximal region refers to the section of the intestine immediately beyond the pyloric ceca. The region between the first and second intestinal fold was called the medial region, and the distal region comprised the part of the intestine from the second intestinal fold to the rectal-anal region. Intestinal segments were sliced into pieces approximately 5 cm in length for every region (three segments per region) and rinsed with marine Ringer solution. The intestinal segments were closed at one end with a surgical string and everted from that end, exposing the mucosa layer to the external hydrolysed protein solutions. After that, an end of the everted intestinal segments was then tied to an end of the glass tubing, which forms part of the system used to measure AA absorption (Rosas *et al.* 2008).

All intestinal segments were preincubated for 5 min at room temperature (22 °C) in a marine Ringer solution and constantly bubbled with carbogen gas (95% O₂ plus 5% CO₂). After being bubbled, the marine Ringer solution was exchanged for the experimental hydrolysed solutions. Each of the glass tubes with intestinal segments attached was filled with 300 µL of marine Ringer solution, and the tubes were submerged in flasks containing the hydrolysed protein

solutions. The carbogen gas was constantly bubbled. Individual samples of 30 µL were taken from each sampling tube at 0, 10, 20 and 30 min and stored at -80 °C until analysis. Samples taken at time 0 were considered to be the specific blank from each replicate. Individual samples were evaluated for AA content using a Waters HPLC equipped with a fluorescence detector (Waters 474 series, Milford, MA, USA). At the end of the absorption study, the intestinal sleeves were opened and measured to calculate the absorptive area.

Samples were chromatographed through a reverse-phase column (3.9 × 150 mm) 4-µm AccQ-Tag™ C-18 (Waters), using the water-acetonitrile gradient recommended by the Waters AccQ-Tag™ system. A fluorescence detector was set up for an excitation wavelength of 250 nm and an emission wavelength of 395 nm. Analyses were run at a constant temperature of 37.5 °C. HPLC signal calibration and standard curves were obtained by using an amino acid standard solution from 12.5 to 150 pmol of each amino acid. All analyses were conducted in triplicate.

Profiles from AA concentrations from FSH muscle and soybean meal (SMH) hydrolysed solutions were reported as a percentage of total AA (AA initial profile, %). Absorption rates were calculated as pmol cm⁻² min⁻¹ from samples of FSH and SMH, reported at 30 and 20 min, respectively, because at these time intervals, the kinetics of absorption were the highest before showing a decrease for most of the AAs for each hydrolysed protein. Amino acid final profiles (%) were given as a percentage of the total absorbed AA.

Statistical analysis

The absorption rates for each AA from the two different hydrolysed proteins (sardine muscle and soybean meal) were compared within the same intestinal fraction and between the three different regions (proximal, medial and distal) within the same polarity categories (cationic, anionic or neutral) using a two-way ANOVA with a split-plot model ($Y_{ijkl} = \mu + T_i + AA_{(ij)} + P_k + TP_{ik} + \varepsilon_{(ijk)}$). This model is attributable to the different AAs being included in each category (cationic, anionic or neutral). In the case of the imino AA (Pro) and free AA (Tau), the absorption rates were compared between the different intestinal regions using a one-way ANOVA. When significant differences were detected between the mean values, a multiple comparison of means was performed using Tukey's test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using the statistical program SIGMA STAT version 3.1 (Arlington, VA, USA).

Results

No significant differences were observed in mucosal cell viability with MTT before 6 h incubation with iced Ringer solution bubbled with carbogen gas (results not shown). Differences in the initial AA profiles were observed between the protein hydrolysates (FSH and SMH; see Tables 1 and 2). The content of essential amino acids (EAA) from the FSH corresponded to 520 g kg⁻¹, whereas it was found to be 557 g kg⁻¹ in the SMH. Amino acids such as Ala and Leu were found in high quantities in both hydrolysates (12.6% and 9.8% in FSH and 8.1% and 9.7% in SMH, respectively, of the total AA). Whereas Arg and His were the AAs with the lowest concentrations registered in the FSH (2.8% and 2.5% from the total AA, respectively), in contrast, these AAs were found in higher quantities in SMH (5.0% and 6.7% of the total AA). In addition, the concentration of Lys in the FSH (7.1% of the total AA) was lower than that found in the SMH (9.2% of the total AA). Methionine was also found at a low percentage in SMH (2.6% of the total AA) compared with the amount found in FSM (3.7% of the total AA).

The total absorption observed over a period of 30 min showed that, even though the initial concentration of EAA in both hydrolysed solutions had been higher than that of the non-essential amino acids (NEAA) were preferentially absorbed at the three intestinal regions for FSH (54.9%, 51.1% and 55.6%, for the proximal, medial, and distal regions, respectively; Table 1; Fig. 1) and SMH (51.4%, 56.4% and 58.7%, for the proximal, medial, and distal regions, respectively; Table 2).

According to their polarity, the AA grouped as cationic, anionic, or neutral, and no differences were found in the absorption rates for the anionic AAs, Asp and Glu, within the three intestinal regions when FSH was used (Table 1; Fig. 1), whereas differences were observed within the medial intestinal region with SMH. The absorption rates of Asp were significantly increased from the proximal to the distal regions for the FSH (7.4, 4.6 and 13.4 pmol cm⁻² min⁻¹, respectively) and SMH (2.9, 6.1 and 6.6 pmol cm⁻² min⁻¹, respectively).

Cationic AAs (Arg, His and Lys) were compared, and no differences were found within the proximal and medial regions using FSH. Only the distal intestinal region showed significant differences in the following order: His ≥ Arg > Lys with 8.2, 6.9 and 0.3 pmol cm⁻² min⁻¹, respectively.

Comparisons between different intestinal regions showed a preferential absorption in the proximal and distal regions for Arg and His only with FSH. However, the absorption rates for Lys showed a decreasing proximal-to-distal gradient

Table 1 Average absorption rates \pm SD (pmol cm⁻² min⁻¹) and amino acid (AA) final profile (% of total AA) from an AA solution (hydrolysed fresh sardine) in the proximal, medial and distal intestinal regions of bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) using the everted intestine system

Amino acids	AA initial profile ¹ (%)	Proximal		Medial		Distal	
		Average absorption rates \pm SD (pmol cm ⁻² min ⁻¹)	AA final profile ² (%)	Average absorption rates \pm SD (pmol cm ⁻² min ⁻¹)	AA final profile ² (%)	Average absorption rates \pm SD (pmol cm ⁻² min ⁻¹)	AA final profile ² (%)
Anionic AA							
Asp*	6.8	7.4 \pm 0.3 ^B	8.0	4.6 \pm 1.6 ^B	8.1	13.4 \pm 2.0 ^A	9.3
Glu*	7.5	9.1 \pm 2.0 ^{AB}	9.8	4.8 \pm 2.3 ^B	8.4	13.1 \pm 1.3 ^A	9.1
Cationic AA							
Arg†	2.8	5.2 \pm 1.3 ^{AB}	5.6	2.9 \pm 0.0 ^B	5.0	6.9 \pm 0.6 ^{a,A}	4.8
His†	2.5	5.3 \pm 1.5 ^{AB}	5.8	2.4 \pm 1.0 ^B	4.2	8.2 \pm 1.3 ^{a,A}	5.7
Lys†	7.1	5.4 \pm 1.0 ^A	5.9	5.0 \pm 1.3 ^A	8.7	0.3 \pm 0.3 ^{b,B}	0.4
Neutral AA							
Ala*	12.6	11.4 \pm 1.8 ^{a,B}	12.3	6.5 \pm 2.0 ^{a,B}	11.3	17.0 \pm 1.9 ^{a,A}	11.8
Gly*	4.8	8.5 \pm 0.5 ^{ab,AB}	9.2	4.9 \pm 1.9 ^{ab,B}	8.6	12.3 \pm 2.2 ^{bc,A}	8.6
Ile†	7.3	3.6 \pm 0.0 ^{cdef,B}	3.9	2.5 \pm 0.3 ^{abc,B}	4.3	6.6 \pm 0.9 ^{de,A}	4.6
Leu†	9.8	6.6 \pm 0.6 ^{bc,B}	7.2	4.1 \pm 0.3 ^{abc,B}	7.1	13.0 \pm 1.4 ^{abc,A}	9.0
Met†	4.3	1.1 \pm 0.3 ^f	1.2	0.9 \pm 0.1 ^c	1.5	1.3 \pm 0.1 ^f	0.9
Phe†	4.7	2.7 \pm 0.5 ^{ef,B}	2.9	1.6 \pm 0.1 ^{bc,B}	2.8	5.3 \pm 0.8 ^{ef,A}	3.7
Ser*	4.2	7.6 \pm 0.5 ^{b,B}	8.2	4.6 \pm 1.2 ^{abc,B}	8.0	13.1 \pm 1.5 ^{ab,A}	9.1
Thr†	8.3	5.7 \pm 1.5 ^{bcde,AB}	6.2	4.9 \pm 0.7 ^{ab,B}	8.6	11.1 \pm 2.6 ^{bc,A}	7.7
Tyr*	4.0	2.8 \pm 0.2 ^{def,AB}	3.0	1.5 \pm 0.2 ^{bc,B}	2.6	4.1 \pm 0.7 ^{ef,A}	2.9
Val†	5.6	6.0 \pm 0.4 ^{bcd,B}	6.5	3.7 \pm 0.5 ^{abc,B}	6.5	11.0 \pm 1.4 ^{bcd,A}	7.6
Imino AA							
Pro*	4.6	3.9 \pm 0.6 ^{AB}	4.2	2.4 \pm 0.9 ^B	4.2	7.3 \pm 1.3 ^A	5.1
Other AA							
Tau	3.1	125.3 \pm 63.8		55.8 \pm 51.6		89.7 \pm 12.5	
EAA (†) Subtotal	52.4		45.1		48.9		44.4
NEAA (*) Subtotal	47.6		54.9		51.1		55.6

Values within the same columns (lower case) and row (upper case) for each group according to the amino acidic polarity with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

AA, amino acids; EAA, essential amino acids; NEAA, non-essential amino acids.

¹ Amino acid percentage from the total AAs in the hydrolysed protein solution.

² Amino acid percentage from the total AAs absorbed in 30 min when the kinetics of absorption were the highest for most of the AAs.

among the different intestinal regions for FSH (5.4, 5.0 and 0.3 pmol cm⁻² min⁻¹ for the proximal, medial and distal regions, respectively; Table 1; Fig. 1) and SMH (6.8, 4.2 and 2.8 pmol cm⁻² min⁻¹ for the proximal, medial and distal regions, respectively; Table 2; Fig. 1).

Several neutral AAs (EAA and NEAA) had higher absorption rates in the distal region when FSH was used, with the exception of Gly, Met, Thr and Tyr (Table 1; Fig. 1). However, when the SMH was used, only Ala, Gly, Leu and Val showed high absorption rates in the medial and distal regions, which were similar for each AA (Table 2; Fig. 1). However, Ala showed the highest absorption rates in the proximal, medial and distal regions when FSH was used (11.4, 6.5, and 17.0 pmol cm⁻² min⁻¹, respectively), but only in the medial and distal regions when using SMH (9.9 and 9.8 pmol cm⁻² min⁻¹, respectively).

In contrast to Ala, Met was the AA with the lowest absorption rate in the three different intestinal regions with

both FSH and SMH (1.1, 0.9 and 1.3 pmol cm⁻² min⁻¹; and 1.1, 1.3 and 1.0 pmol cm⁻² min⁻¹, respectively), with the differences being significantly similar along the regions.

The imino AA, Pro, gave high absorption rates within the distal region when the FSH was used (7.3 pmol cm⁻² min⁻¹), whereas no significant differences were observed between regions when SMH was used.

The free AA taurine (Tau) was found in all cases (Tables 1 and 2) to have high absorption rates that were ten or more times higher than the absorption rates reported for the other AAs. However, owing to their high concentration, no significant differences could be found between the different treatments and regions.

Discussion

The intestine of fish does not have true physical differentiation as in terrestrial vertebrates (Ferraris & Ahearn 1984).

Table 2 Average absorption rates \pm SD ($\mu\text{mol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) and amino acid (AA) final profile (% of total AA) from an AA solution (hydrolysed soybean meal) in the proximal, medial and distal intestinal regions of bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) using the everted intestine system

Amino acid	AA initial profile ¹ (%)	Proximal		Medial		Distal	
		Average absorption rates \pm SD ($\mu\text{mol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)	AA final profile ² (%)	Average absorption rates \pm SD ($\mu\text{mol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)	AA final profile ² (%)	Average absorption rates \pm SD ($\mu\text{mol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)	AA final profile ² (%)
Anionic AA							
Asp [•]	7.4	2.9 \pm 2.3 ^B	4.9	6.1 \pm 0.8 ^{b,A}	6.9	6.6 \pm 0.2 ^A	8.0
Glu [•]	5.1	7.9 \pm 2.2 ^B	13.4	11.3 \pm 2.2 ^{a,A}	12.7	9.3 \pm 2.2 ^{AB}	11.3
Cationic AA							
Arg [†]	5.0	4.9 \pm 0.7	8.2	4.9 \pm 1.2	5.5	4.3 \pm 1.6	5.3
His [†]	6.7	2.9 \pm 1.5	4.8	4.4 \pm 0.8	5.0	3.5 \pm 1.2	4.3
Lys [†]	9.2	6.8 \pm 0.8 ^{AB}	11.6	4.2 \pm 3.7 ^A	4.4	2.8 \pm 1.1 ^B	3.4
Neutral AA							
Ala [•]	8.1	5.9 \pm 2.6 ^B	9.9	9.9 \pm 1.2 ^{a,A}	11.1	9.8 \pm 1.6 ^{a,A}	12.0
Gly [•]	6.1	5.8 \pm 1.7 ^B	9.7	8.9 \pm 1.6 ^{ab,A}	10.0	9.1 \pm 0.7 ^{a,A}	11.1
Ile [†]	6.1	1.7 \pm 1.6	2.8	3.2 \pm 0.3 ^{fg}	3.6	3.0 \pm 0.1 ^{cd}	3.7
Leu [†]	9.7	2.6 \pm 2.5 ^B	4.3	5.6 \pm 0.2 ^{cde,A}	6.3	5.0 \pm 0.7 ^{bc,AB}	6.1
Met [†]	2.6	1.1 \pm 0.5	1.9	1.3 \pm 0.2 ^g	1.5	1.0 \pm 0.3 ^d	1.2
Phe [†]	5.5	1.2 \pm 1.1	2.1	2.4 \pm 0.3 ^{fg}	2.8	2.1 \pm 0.4 ^{cd}	2.6
Ser [•]	6.8	4.4 \pm 2.0	7.4	7.1 \pm 0.8 ^{bcd}	8.0	7.2 \pm 0.2 ^{ab}	8.8
Thr [†]	4.3	5.0 \pm 1.4	8.5	7.6 \pm 0.2 ^{bc}	8.6	6.9 \pm 2.2 ^{ab}	8.4
Tyr [•]	4.1	1.2 \pm 1.0	2.1	2.2 \pm 0.2 ^g	2.5	2.0 \pm 0.4 ^{cd}	2.4
Val [†]	6.6	2.6 \pm 2.1 ^B	4.4	5.4 \pm 0.2 ^{de,A}	6.1	5.2 \pm 0.1 ^{bc,AB}	6.4
Imino AA							
Pro [•]	6.7	2.4 \pm 1.0	4.0	4.5 \pm 0.4	5.1	4.2 \pm 0.1	5.1
Other AA							
Tau		136.3 \pm 2.0		139 \pm 37.2		97.0 \pm 58.2	
EAA (†) Subtotal	55.7		48.6		43.6		41.3
NEAA (•) Subtotal	44.3		51.4		56.4		58.7

Values within the same columns (lower case) and row (upper case) for each group according to the amino acidic polarity with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

AA, amino acids; EAA, essential amino acids; NEAA, non-essential amino acids.

¹ Amino acid percentage from the total AAs in the hydrolysed protein solution.

² Amino acid percentage from the total AAs absorbed in 20 min when the kinetics of absorption were the highest for most of the AAs.

The latter have well-defined regions depending on their nutritional habits and food resources, and in general, it is easy to clearly distinguish between the different regions within the small and large intestine. Nevertheless, some fish species, mainly carnivores, have certain different anatomical, histological and physiological characteristics of the intestine that serve to distinguish some apparent regions referred to as proximal, medial and distal (Buddington *et al.* 1987; Rust 2002). According to anatomical features (folds and sphincters) and enzymatic characteristics, in the present study the intestine of the Pacific bluefin tuna was divided into proximal from just after the ceca; medial between the two folds of the intestine; and finally the distal region. These regions were used in the present work to investigate any possible inter-regional differences in AA absorption.

Bluefin tuna is a highly specialized carnivorous fish characterized by a very short intestine related to its body size (relative gut length RGL: gut length/fork length = 0.3

according to our samples), compared with the relative gut length of omnivorous (e.g. catfish, RGL = 0.75; Buddington *et al.* 1987) and herbivorous (e.g. grass carp, RGL = 2; tilapia, RGL = 6; Buddington *et al.* 1987). Such a difference has consequences for food retention time and absorptive efficiency (Ferraris & Ahearn 1984). Therefore, the short intestine in bluefin tuna should be compensated by a high absorptive capacity throughout its intestinal tract, as shown in the present work. Here, it was generally observed that the medial and distal intestinal segments have higher absorption rates than those registered in the proximal fraction. However, differences were observed among some particular AA absorbed in the intestinal segments, in addition to differences found between the two protein sources.

Earlier studies in salmon (Berge *et al.* 1999; Bakke-McKellep *et al.* 2000) have shown that the pyloric ceca and proximal intestine have the highest absorptive capacity compared with the following intestinal sections, which can be

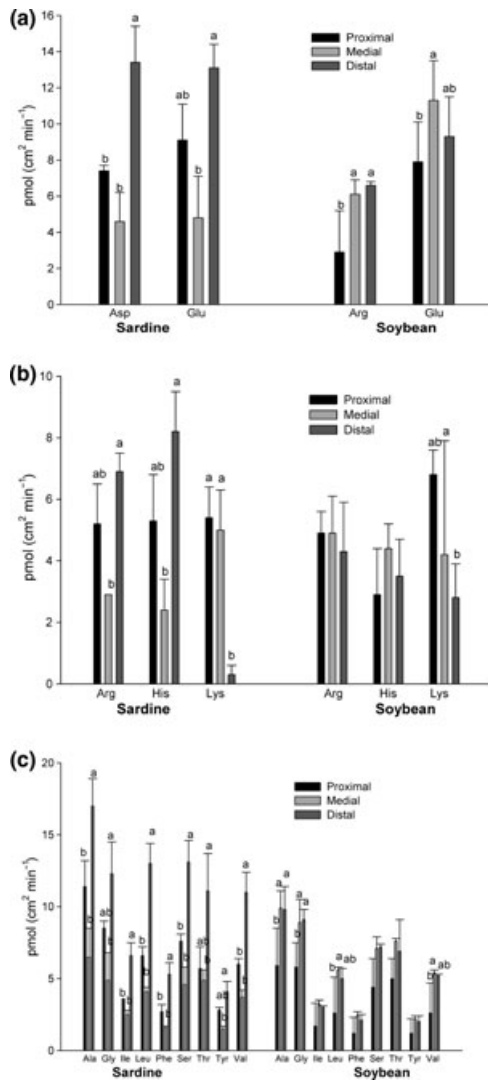


Figure 1 Average absorption rates \pm SD (pmol cm⁻² min⁻¹) from two amino acid solutions (hydrolysed sardine and soybean meal) in the proximal, medial and distal intestinal segments for (a) anionic, (b) cationic and (c) neutral groups. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$) within each amino acid.

explained by the higher number of transporters, greater amount of enzyme secretory tissue and higher substrate concentration found in these regions. In the present study, the average absorption rates for AAs such as Asp, Ala, Ile, Leu, Phe, Ser and Val using FSH were higher in the distal intestinal region than in the proximal and medial regions. Here, the absorption rates were evaluated using the same hydrolysed protein concentration in the three intestinal regions, providing an equal AA availability for absorption, whereas in an *in vivo* evaluation, the AA concentration diminishes and changes along the intestine. Bakke-McKellep

et al. (2000) observed that the pyloric ceca and proximal intestinal regions from Atlantic salmon were able to absorb 84–92% of hydrolysed protein – a higher amount than that reported from *in vivo* experiments (59% for the end of the proximal region; Krogdahl *et al.* 1999). These authors argue that such discrepancies could be attributable to differences in the hydrolytic process. In the present study, the AA availability for all three sections was the same and absorption rates were evaluated instead of the total absorption. The present approach gives a better physiological meaning, demonstrating the intake capability of the intestinal fraction immersed in a mixture of peptides and free AAs. Here, the complex mixture of AAs from two different protein sources and digested by the same endogenous enzymes was used, where different interactions between them could be observed. For instance, the reason for the AAs in SMH to be absorbed at lower rates despite their presence could mean a difference in the digestive capability to delay the absorption process, where tissue enzymes from the intestine are the final process to be absorbed.

Moreover, the fact that, in the present work, higher AA absorption rates were found in the distal fraction for both protein hydrolysates could also be an evolutionary adaptation to compensate for the short intestinal length, so as to improve absorptive efficiency. Therefore, the genetic expression of transporters and histological studies to identify and characterize the protein transporters from the intestinal tract in the bluefin tuna are needed to corroborate this hypothesis.

The lower absorption rate of glucogenic AAs such as Asp and Glu (mainly in SMH) registered in the proximal fraction compared with the following intestinal fractions could be attributable to an underestimation as a result of the high catabolic activity registered for these AAs in the intestinal mucosa layer for the proximal intestinal fraction (Wu 1998). Not all AAs are absorbed to pass through the enterocytes to the plasma; these AAs are also an important energy source for the intestinal mucosa, in addition to their role in synthesizing the essential precursors of glutathione, nitric oxide, polyamides, purines, nucleotides and other AA, indispensable for the maintenance of the mucosal intestinal tissue (Stoll *et al.* 1998; Wu 1998). Thus, only a small amount from the initially absorbed concentration for these AAs will be available for extra-intestinal processing. In contrast, Ala had the highest absorption rates in the different intestinal fractions when FSH was the protein source, which is consistent with our previous studies on bluefin tuna (Rosas *et al.* 2008; Martínez-Montaña *et al.* 2010). High postprandial blood concentrations of Ala are related to transamination processes

inside the enterocytes; therefore, this AA plays an important role as a nitrogenous transporter of several dietary AAs to extra-intestinal tissues (Wu 1998). Moreover, Ala could be synthesized from pyruvate through a reversible reaction catalysed by the alanine transaminase.

Lys showed a particular behaviour, being absorbed at higher rates in the proximal region, with an evident gradual decrease along the intestinal tract for both protein substrates (FSH and SMH). The higher absorption rate for Lys in the proximal intestine shows that, compared with other AAs, this region has an important absorptive capacity for this AA compared with the rest of the intestine. In previous studies where Lys was chosen as an absorption indicator, it was concluded that Lys cannot undergo a transamination process and its use is restricted for the oxidative process, and therefore, this AA is absorbed directly into the plasma (Berge *et al.* 1994; Ball *et al.* 2007). Hence, in the bluefin tuna, the proximal fraction is the main intestinal region for Lys absorption regardless of the AA bioavailability or protein source.

Soybean meal is considered to be a valuable protein source owing to its high protein levels and suitable AA profile, showing good results when used in balanced diets for salmon (Storebakken *et al.* 1998; Cheng *et al.* 2003) and other carnivorous fish (Day & Plascencia-González 2000). However, soybean meal has been found to be deficient in some EAA, mainly Met, which is corroborated in the present work. Moreover, when SMH was used, an overall reduction in the AA absorption rate was observed, even if the initial AA content for certain AAs (e.g. Asp, Leu and Tyr) was similar for both experimental solutions (FSH and SMH). The differences in the absorption rates between the two protein sources, consistent with *in vivo* experiments on other species (Krogdahl *et al.* 2003), could be explained by the lower protein digestibility reported for soybean meal, in addition to antinutrient factors such as AA-carbohydrate interactions, which interfere with the absorptive process (Francis *et al.* 2001), or enzymatic inhibitors, which are not guaranteed to be eliminated by the treatment of soybean meal by heating, defatting or germination (El-Sayed *et al.* 2000). Finally, the digestive processes carried out in the intestinal fraction tissue to complete the protein fractionation can be delayed if protein fractions are less digested, if this is the case for the SMH.

Moreover, it is necessary to consider that a certain amount of AAs are assimilated in their intact form by processes such as apparent diffusion (Ferraris & Ahearn 1984), paracellular absorption (Nellans 1991), or endocytosis. In previous studies using the everted intestinal system

(Martínez-Montaño *et al.* 2010), apparent diffusion in the proximal intestinal region was important for Asp and Pro, because their absorption was proportionally affected by the protein solution concentration. However, AAs obtained through apparent diffusion will vary along the intestine, or even within the same region, and this could overestimate the absorption rates for some AAs (Schep *et al.* 1997; Bakke-McKellep *et al.* 2000). For this reason, it will be important to perform further studies to evaluate the contribution of apparent diffusion to the net intestinal absorption of AA.

The AA absorption rates from the proximal and medial intestinal fractions were relatively lower than those from the distal fraction when FSH was used; however, it has been observed that absorption processes in specific intestinal regions could be modified according to the AA supply used (Rosas *et al.* 2008; Martínez-Montaño *et al.* 2010). Moreover, it has also been demonstrated that there is a definite variation among species, physiological conditions and feeding regimes (Webb 1990). This underlines the importance of the present study to be performed with other species and protein sources, using intestine segments and compared to a standard fish as model under similar physiological conditions to create a laboratory model to do direct fish comparisons. And last, to be able to perform this kind of studies on large species that would be difficult to do *in vivo* studies.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Project C01-45785 and SAGARPA/CONACYT 109150. We thank Bajamachi SA de RL for their kind donation of fish, and Emmanuel Martínez-Montaño and Emyr Peña thank CONACyT for their fellowships for graduate studies.

References

- Alarcón, F.J., Moyano, F.J. & Díaz, M. (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 1–8.
- Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, Å. & Buddington, R.K. (2000) Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, **22**, 33–44.
- Ball, R.O., Urschel, K.L. & Pencharz, P.B. (2007) Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *J. Nutr.*, **137**, 1626S–1641S.
- Berge, G.E., Lied, E. & Espe, M. (1994) Absorption and incorporation of dietary free and protein bound ($U^{14}C$)-lysine in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, **109**, 681–688.

- Berge, G.E., Bakke-McKellep, A.M. & Lied, E. (1999) *In vitro* uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **179**, 181–193.
- Buddington, R.K., Chen, J.W. & Diamond, J.M. (1987) Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.*, **393**, 261–281.
- Carter, C.G., Seeto, C.G., Smart, A., Clarke, S. & van Barneveld, R.J. (1998) Correlates of growth in farmed juvenile southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* (Castelnaud). *Aquaculture*, **161**, 107–119.
- Carter, C.G., Bransden, M.P., van Barneveld, R.J. & Clarke, S.M. (1999) Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: *in vitro* digestibility. *Aquaculture*, **179**, 57–70.
- Charat, P. & Valdez, M. (2008) Systems and Methods for Producing Extruded Fish Product for Use in Fish Farming. United States Patent Application 20090011090. Maricultura del Norte, S. de R.L. de C.V. (Ensenada, Mx).
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W. & Usry, J.L. (2003) Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. *Aquaculture*, **218**, 553–565.
- Clarke, S., Smart, A., van Barneveld, R. & Carter, C. (1997) The development and optimization of manufactured feeds for farmed southern bluefin tuna. *Austasia Aquacult.*, **11**, 59–62.
- Day, O.J. & Plascencia-González, H.G. (2000) Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquacult. Nutr.*, **6**, 221–228.
- El-Sayed, A.F.M., Martínez, I.N. & Moyano, F.J. (2000) Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using *in vitro* assays. *Aquacult. Inter.*, **8**, 403–415.
- Ferraris, P.B. & Ahearn, A.G. (1984) Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **77**, 397–413.
- Francis, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, **199**, 197–227.
- Holst, C.M. & Oredsson, S.M. (2005) Comparison of three cytotoxicity test in the evaluation of cytotoxicity of a sperine analogue on human breast cell lines. *Toxicol. In Vitro*, **19**, 379–387.
- Krogdahl, Å., Nordrum, S., Sørensen, M., Brudeseth, L. & Røsjo, C. (1999) Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquacult. Nutr.*, **5**, 121–133.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M. & Baeveerjord, G. (2003) Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Nutr.*, **9**, 361–371.
- Mailliard, E., Stevens, B.R. & Mann, G.E. (1995) Amino acid transport by small intestinal, hepatic and pancreatic epithelia. *Gastroenterology*, **108**, 888–910.
- Martínez-Montaño, E., Peña, E., Focken, U. & Viana, M.T. (2010) Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): *in vitro* uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture*, **299**, 134–139.
- Matthews, J.C. (2000) Amino acids and peptide transport systems. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition* (D'Mello, J.P.F. ed.), pp. 3–20. CAB International, Wallingford, UK.
- Matus-de-la-Parra, A., Rosas, A., Lazo, J.P. & Viana, M.T. (2007) Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.*, **33**, 223–231.
- Navarrete-del-Toro, M.A. & García-Carreño, F.L. (2002) Evaluation of the progress of protein hydrolysis. In: *Unit B. Biochemical Compositional Analyses of Protein. Curr. Protocol. Food Anal. Chem.*, **1**, B2.2.1–B2.2.14, John Wiley and Sons.
- Nellans, H.N. (1991) Mechanisms of peptide and protein absorption. (I). Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **7**, 339–364.
- Rosas, A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Shimada, A., D'Abrahamo, L.R. & Viana, M.T. (2008) Comparative intestinal absorption of amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquacult. Nutr.*, **14**, 481–489.
- Rust, M.B. (2002) Nutritional physiology. In: *Fish Nutrition* (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds), 3rd edn, pp. 367–452. Academic Press, San Diego, CA.
- Schep, L.J., Tucker, I.G., Young, G. & Butt, A.G. (1997) Regional permeability differences between the proximal and distal portions of the isolated salmonid posterior intestine. *J. Comp. Physiol.*, **167**, 370–377.
- Stevens, E.D. & McLeese, J.M. (1984) Why bluefin tuna have warm tummies: temperature effect on trypsin and chymotrypsin. *Am. J. Physiol.*, **246** (Regul. Integr. Comp. Physiol.), R487–R494.
- Stoll, B., Henry, J., Reeds, P.J., Yu, H., Jahoor, F. & Burrin, D.G. (1998) Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.*, **128**, 606–614.
- Storebakken, T., Shearer, K. & Roem, A. (1998) Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, **161**, 365–379.
- Urán, P.A., Schrama, J.W., Rombout, J.H.W.M., Obach, A., Jensen, L., Koppe, W. & Verreth, J.A.J. (2008) Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different temperatures. *Aquacult. Nutr.*, **14**, 324–330.
- Viana, M.T. & Raa, J. (1991) Lysozyme-like enzyme from the scallop *Chlamys islandica*. *Ciencias Marinas*, **18**, 93–107.
- Webb, K.E. Jr (1990) Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J. Anim. Sci.*, **68**, 3011–3022.
- Wu, G. (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.*, **128**, 1249–1252.
- Zertuche-González, J.A., Sosa-Nishizaki, O., Vaca-Rodríguez, J.G., del Moral Simanek, R., Yarish, C. & Costa-Pierce, B.A. (2008) *Marine Science Assessment of Capture-Based Tuna (Thunnus orientalis)* Aquaculture in the Ensenada Region of Northern Baja California, Mexico. Final Report of the Binational Scientific Team to the Packard Foundation, Los Altos, CA.

1.4 Discusión general

El sistema dinámico del intestino invertido acoplado al método del pH-Stat ha resultado ser una herramienta versátil cuyo empleo tiene distintas ventajas sobre otros métodos utilizados. Una de las principales es el poder manejar como fuentes de aminoácidos (AAs) a los hidrolizados de los alimentos comúnmente empleados durante su maricultivo (sardina, anchoveta, calamar, etc.) y compararlos contra otras potenciales fuentes proteicas (p. ej. soya); además de utilizar enzimas digestivas propias de los organismos bajo estudio para elaborar los hidrolizados proteicos. El poder usar relaciones enzimas/ sustrato (E/S) cercanas a las existentes en los peces vivos y emplear los tejidos intestinales con adecuada viabilidad celular, hace que este tipo de ensayos *in vitro* se asemeje más a lo que ocurre en los procesos digestivos *in vivo* (Rosas *et al.*, 2008; Morales y Moyano, 2010). Por otra parte, al emplear los tejidos intestinales además de las enzimas digestivas que se secretan al lumen, se incluyen una variedad de enzimas presentes en la membrana intestinal tales como las aminopeptidasas (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007), fosfatasas alcalinas entre otras, que están involucradas en la digestibilidad proteica y en el transporte de péptidos y AAs (Ferraris y Ahearn, 1984).

Emplear tejidos intestinales con una viabilidad celular demostrada, fue fundamental para la realización de los ensayo de absorción intestinal *in vitro* del presente estudio, lo cual fue hecho con el objetivo de reducir al máximo probables interferencias en las tasas de absorción de los AAs a causa del estrés fisiológico

que pudieran presentar dichos tejidos. Rosas *et al.* (2008) observaron que en intestinos de trucha arcoíris *O. mykiss*, tras 8 horas *post-mortem* la absorción máxima para la mayoría de los AAs decrecía significativamente. En contraste, la absorción del Glu (un AA glucogénico) incrementó al doble de la absorción registrada en intestinos frescos. Lo cual, de acuerdo a Rosas *et al.* (2008) pudo ser resultado de un requerimiento energético alto de los tejidos frente al estrés fisiológico de los tejidos al verse privados de la circulación sanguínea, y por ende, la tener una pobre oxigenación y un limitado suministro de nutrientes.

Por lo tanto, previo a la realización de los ensayos de absorción, se evaluó el decaimiento de la viabilidad celular en los tejidos intestinales tras el sacrificio de los organismos empleando sales de tetrazolium o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium). Este método ha sido usado ampliamente para distinguir células vivas de muertas y está basado en la reducción de las sales de tetrazolium a un complejo coloreado insoluble en agua conocido como formazano, a consecuencia de la adición de electrones provenientes de la acción de varias deshidrogenasas, que pueden ser enzimas citosólicas o mitocondriales de la cadena respiratoria (Stowe *et al.*, 1995). De esta manera, registramos que la viabilidad celular de los segmentos intestinales no presentaba diferencias significativas durante las primeras tres horas *post-mortem* de los ejemplares usados. Por esto, los ensayos de absorción intestinal se realizaron en un tiempo menor a 3 horas para evitar posibles efectos adversos en los procesos involucrados en la absorción intestinal de algunos AAs.

IV.1 La absorción intestinal preferencial de los aminoácidos no esenciales sobre los aminoácidos esenciales del atún aleta azul T. orientalis

El uso de diferentes fuentes proteicas y extractos enzimáticos de los ciegos pilóricos del atún aleta azul *T. orientalis*, generaron hidrolizados proteicos con perfiles distintos de AA libres biodisponibles. En el Capítulo I (Martínez-Montaña *et al.*, 2010), se mostró que los AA esenciales (AAE) y no esenciales (AANE) resultaron ser el 57.9% y el 42.1% del total de los AAs libres en el hidrolizado proteico elaborado con harina de músculo de sardina, teniendo una relación de AAE con respecto a los AAs totales (Relación E:T; Heger, 2003) de 0.58 . Siendo este perfil ligeramente diferente a los reportados en el Capítulo II (Martínez-Montaña *et al.*, 2011) al emplear tanto harina de músculo de sardina de un lote diferente como harina de soya, en donde se obtuvieron relaciones E:T de 0.52 y 0.56, respectivamente. Estas proporciones son diferentes al compararlas con los perfiles de AAs reportados por Rosas *et al.* (2008) donde se observa una relación E:T de 0.71 al emplear el digerido pancreático de caseína comercial Bacto™ tryptone.

Para el presente estudio, se observó que al emplearse hidrolizados de músculo de sardina o harina de soya se favoreció la absorción de AANE con respecto a los AAE, sin importar la concentración proteica del hidrolizado. Contrario a lo registrado por Rosas *et al.* (2008) quienes reportaron una mayor absorción de AAE sobre los AANE en atún aleta azul al emplear la Bacto™ tryptone en ensayos de absorción en donde las condiciones

experimentales (p. ej. bioquímicas y fisicoquímicas) fueron idénticas. Lo que hace suponer que las diferencias entre las tasas de absorción de los AAs pudieron deberse a su biodisponibilidad diferencial en los hidrolizados, lo que a su vez promovió diferencias en la competencia por los transportadores proteicos u otro tipo de interacciones a causa de la baja especificidad de estos.

Así también, se registró que sin importar la fuente proteica del hidrolizado empleado en los ensayos de absorción, los AANE tales como Ala y Gly fueron absorbidos preferentemente sobre otros AAs en las secciones intestinales evaluadas (proximal, media y distal) en el atún aleta azul *T. orientalis*, llegando a ser en algunos casos más del 40% del total de los AAs cuantificados, lo que concuerda con lo reportado por Peña-Marín (2010) en esta misma especie y empleando el mismo método. Las concentraciones altas de Ala cuantificadas en los ensayos de absorción realizados en el presente estudio, pudieron ser producto del catabolismo de AAs dentro del tejido intestinal, ya que este órgano junto con el músculo, el hígado y el cerebro, son las principales zonas de su síntesis y catabolismo en animales (Wu, 1998).

En los mamíferos, varios AANE son extensamente oxidados por los enterocitos del epitelio intestinal, de tal manera que la mayor parte de ellos que fueron obtenidos de la proteína en el alimento no llegan a entrar a la vena porta (Stoll *et al.* 1998; Wu 1998). Se ha cuantificado que más del 95% de los AAs glucogénicos como Asp, Gln y Glu son catabolizados por el tubo gastrointestinal para proveer de la energía necesaria para aquellos procesos metabólicos ATP-

dependientes (Wu, 1998; Bequette, 2003), debido a que la glucosa sólo contribuye con un 35% de la energía intestinal (Reeds *et al.*, 1998). Los principales productos nitrogenados obtenidos de la oxidación de los AANE incluyen a Ala, Arg, ornitina (Orn) y citrulina (Cit). De estos productos, la Cit es liberada a la vena porta y convertida a Arg en los riñones (Wu, 2009). La Ala, que es la forma principal en cómo se transportan los productos nitrogenados de algunos aminoácidos a los tejidos extraintestinales, es liberada a la vena porta y llevada al hígado para ser transformada en glucosa o en Gln para ser esta última reciclada en el intestino como fuente energética (Wu, 1998). En cambio la Arg es convertida a Cit, óxido nítrico, Orn, poliaminas y urea en tejidos extraintestinales (Bequette, 2003; D'Mello, 2003b).

En peces no ha sido estudiado de manera integral el proceso del metabolismo de los AAs durante su paso a través de la pared intestinal, dado a que la mayoría de estudios sobre absorción intestinal son realizados empleando AAs marcados con isótopos radioactivos tales como el ^{12}C , ^{14}C o ^3H , evaluando sólo la incorporación de estos AAs radiomarcados a los enterocitos sin considerar los posteriores procesos metabólicos. Es aquí donde radica una de las principales ventajas del sistema del intestino invertido dinámico propuesto por Rosas *et al.* (2008), dado que el muestreo de los AAs se lleva a cabo en la parte serosa de la sección intestinal estudiada, obteniendo los AAs que provienen tanto de la proteína dietaria y/o del producto de las reacciones metabólicas del intestino. Sin embargo, como está diseñado actualmente representa aún a una “caja negra” en

donde se desconocen los procesos metabólicos y únicamente se evalúan los productos aminoacídicos de éstos.

Una respuesta a este problema sería el empleo de AAs marcados con isótopos estables en el sistema del intestino invertido. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios de nutrición en mamíferos, en donde un nutriente (aminoácido, glucosa, glicerol) es marcado con algún isotopo estable (De-Meer *et al.*, 1999). De esta manera, se puede evaluar que porcentaje de un AA marcado e incluido en un hidrolizado, es metabolizado o transportado íntegramente a la parte serosa intestinal. Por lo tanto, es imprescindible realizar este tipo de estudios en peces a la brevedad posible, ya que incluso se ha observado que en mamíferos terrestres las tasas metabólicas intestinales para AAE durante su primer paso llegan a ser entre un 30 a 50% de los AAE dietarios ingeridos (Stoll *et al.*, 1998), siendo de los más altos el de Leu (32%), Phe (35%) y el de Thr (61%).

IV.2 Absorción intestinal e interacciones entre la arginina y la lisina

Las principales interacciones en la absorción de AAs a nivel intestinal, han sido descritas como:

(1) Interacciones negativas tales como los antagonismos entre aminoácidos con estructuras análogas y que compiten por el mismo sistema de transporte, tales

como los observados para los AAs de cadena ramificada (alifáticos) como son la Leu, Ile y Val, en donde un exceso de Leu en la dieta inhibe la absorción de la Val y la Ile en algunos organismos (D'Mello, 2003a). En el bagre de canal *Ictalurus punctatus* se han reportado estas interacciones entre AAs de cadena ramificada, sin embargo, no parecen ser tan severas como las reportadas para otros organismos (Robinson *et al.*, 1984). Otro antagonismo comúnmente reportado es el de Arg y Lys, ampliamente estudiado en salmónidos (Berge *et al.*, 1999) y en la anguila europea *A. anguilla* (Vilella *et al.*, 1990), en donde un exceso en la concentración de uno de los dos AAs inhibe la absorción del otro, a consecuencia de compartir los mismos sistemas de transporte Na^+ -dependiente (B^{0+}) y Na^+ -independiente (b^{0+} e y^+ ; Mailliard *et al.*, 1995).

(2) Interacciones positivas como es el proceso de la trans-estimulación que se ha llegado a observar para los AAs catiónicos tales como la Arg y Lys, en donde la absorción de éstos es estimulada por la acumulación de otros AAs catiónicos o el ión Na^+ a nivel intracelular o intravesicular (Bröer, 2008). Inclusive, se ha observado que la Leu (un AA neutro) estimula la absorción de la Lys en células del epitelio intestinal, ya que la Leu intracelular podría funcionar como un modulador alostérico positivo (Bröer, 2008).

Los resultados de los experimentos realizados en el presente estudio empleando la región proximal del intestino, no revelaron ningún tipo de interacción sobre las tasas de absorción entre los AAs catiónicos, a pesar de las concentraciones altas de Lys (7 al 12% del total de los AAs) con respecto a las

concentraciones de Arg e His (4-5% y 5-7% del total de los AAs, respectivamente) en los hidrolizados empleados. Esto concuerda con lo reportado con Rosas *et al.* (2008) para el atún aleta azul *T. orientalis*. El antagonismo entre Arg y Lys entre las especies es muy variable, en vertebrados terrestres sólo se ha registrado en pollos, perros y ratas, más no así en gatos y puercos (Ball *et al.*, 2007). En peces, la interacción entre de estos dos AAs tampoco es clara, como lo han demostrado experimentos en híbrido de la lobina rayada híbrida (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*; Griffin *et al.*, 1994) y trucha arcoíris *O. mykiss* (Barash, 1984). Solamente en alevines de bagre de canal *Ictalurus punctatus* se ha encontrado una respuesta plasmática en los niveles de Arg y Lys cuando se les administró un alimento desbalanceado con estos AAs (Robinson *et al.*, 1984), sin embargo, no se esclareció si esta respuesta es debida a mecanismos metabólicos y/o de absorción intestinal. En estudios con del salmón del Atlántico *S. salar*, se ha reportado que la Lys puede tener tanto un efecto inhibitorio como uno estimulador sobre la Arg, dependiendo de la concentración relativa de los dos AAs, tanto a nivel de absorción intestinal como a nivel metabólico (Berge *et al.*, 1998). En cambio, la Arg tiene solamente un efecto inhibitorio sobre la Lys sin importar la concentración luminal de la Arg (Berge *et al.*, 1999). Contrario a esto, Peña-Marín (2010) en un estudio donde se evaluó el efecto del desbalance entre Arg y Lys empleando el sistema del intestino dinámico invertido en el atún aleta azul *T. orientalis*, reportó una estimulación de la Arg hacia la absorción de Lys; sin embargo, la Lys no mostró ninguna interacción hacia la absorción de Arg. Esto explica nuestros resultados, pues aún cuando en los hidrolizados de sardina la

relación Lys/Arg era de 2.5-2.8, la absorción intestinal *in vitro* de estos fue 1:1. Por lo tanto, la Lys parece no inhibir la absorción de Arg en el atún aleta azul, sin embargo, es necesario realizar estudios para ver el efecto de un desbalance de estos AAs a nivel metabólico.

Por su parte, la Lys registró un comportamiento particular en comparación al resto de los AAs analizados, debido a que se observó un gradiente decreciente gradual de la región proximal a la distal, sin importar el origen del hidrolizado proteico. En estudios previos de absorción e incorporación de AAs en salmónidos (Berge *et al.*, 1994), se ha empleado a la Lys como un AA marcador de la absorción intestinal debido a su absoluta esencialidad, su restringido uso en procesos oxidativos y que, al igual que la Thr, no experimenta procesos de transaminación (Bequette *et al.*, 2003). Por lo tanto, este AA es absorbido directamente hacia el plasma sanguíneo o es empleado directamente por el intestino para la síntesis de proteína. Sin embargo, hasta la fecha es poco lo que se conoce acerca del papel de la Lys en la función intestinal (Wang *et al.*, 2009). Es así que puede concluirse que en el atún aleta azul la región proximal es la principal zona intestinal para la absorción de Lys sin importar la biodisponibilidad de la Lys o la fuente proteica.

IV.3 La alta capacidad de absorción de AAs en el tubo intestinal del atún aleta azul T. orientalis

Como se mencionó en los antecedentes del presente estudio, los juveniles de atún aleta azul *T. orientalis* poseen un tubo intestinal demasiado corto con relación a su longitud corporal, lo cual es característico de los peces carnívoros como los salmones, truchas, lenguados, bacalaos, etc. (Rust, 2002). Con mediciones morfológicas realizadas durante los muestreos realizados en a las granjas atuneras, calculamos la longitud intestinal relativa (RGL, por sus siglas en inglés= longitud del intestino/longitud furca) de los ejemplares empleados la cual fue de 0.3. Esta RGL es demasiado corta si se compara con la reportadas para algunos peces omnívoros (p. ej. Bagre de canal *Ictalurus punctatus*, RGL = 0.75; Esturión *Acipenser transmontanus*, RGL = 0.6; Buddington *et al.*, 1987), herbívoros (P. ej. Carpa común *Cyprinus carpio*, RGL= 2.1; Carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella*, RGL = 1.9; Tilapia de vientre rojo *Tilapia zillii*, RGL = 5.8; Buddington *et al.*, 1987) e inclusive a la de otros peces carnívoros estrictos (P. ej. lobina rayada *Morone saxatilis*, RGL = 0.46; Trucha arcoíris *O. mykiss*, RGL = 0.49 Buddington *et al.*, 1987). Es probable que el atun aleta azul con su intestino relativamente corto haya adquirido en su evolución alguna estrategia digestiva para compensar lo corto de su intestino y aumentar la eficiencia en su capacidad de absorción a lo largo del todo el tubo intestinal mediante el incremento de transportadores y/o engrosamiento de la capa serosa. Sin embargo, es necesario analizar la distribución de la expresión genética de los transportadores, estudios

histológicos y realizar más ensayos de cinética de absorción, todo esto con la finalidad de identificar y caracterizar las proteínas transportadoras del tracto intestinal en el atún aleta azul *T. orientalis* para corroborar esta hipótesis.

En el presente trabajo, a diferencia de otros estudios de absorción intestinal, no se observó un gradiente decreciente en las tasas de absorción de la región proximal a la distal como se ha registrado para varias especies de peces en otros estudios (Ferraris y Ahearn, 1984; Buddington *et al.*, 1987; Buddington y Diamond, 1987; Bakke-McKellep *et al.*, 2000), lo que indica que aparentemente todo el tubo intestinal tiene la misma capacidad de absorción para AAs libres. Estudios realizados con salmónidos, han reportado que la región de los ciegos pilóricos, así como la región proximal intestinal poseen una alta capacidad de absorción en comparación a las demás regiones intestinales y se ha sugerido que pudiera estar directamente relacionado al número de transportadores presentes en una región, al área superficial intestinal, a la cantidad de tejido secretor de enzimas y las concentraciones altas de los sustratos para estas regiones (Ferraris y Ahearn, 1984; Berge *et al.*, 1999; Bakke-McKellep *et al.*, 2000). En contraste, en el presente estudio se observó que para algunos AAs en particular, las tasas de absorción fueron más altas en los segmentos medios y distales intestinales en comparación a los registrados en la región proximal, lo cual también varió de acuerdo a la fuente proteica utilizada. De este modo, al utilizar un hidrolizado proteico elaborado con harina de músculo de sardina AAs tales como Asp, Ala, Ile, Leu, Phe, Ser y Val tuvieron tasas de absorción más altas en la región distal con

respecto a las regiones proximal y media. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este trabajo los análisis de absorción fueron realizados usando una misma concentración proteica del hidrolizado en las tres regiones intestinales, lo que provee de una biodisponibilidad de los AAs igual para la absorción, mientras que en una evaluación *in vivo*, la concentración de los AAs disminuye y cambia conforme viaja a lo largo del intestino. Por lo tanto, el presente trabajo tiene un mayor significado fisiológico, demostrando la capacidad de absorción de las fracciones intestinales inmersas en una mezcla de AAs libres y péptidos.

En el presente trabajo, además de evaluar la absorción de AAs provenientes de la harina de músculo de sardina, se evaluó las tasas de absorción de un hidrolizado de harina de soya, debido a que esta última es considerada como una fuente proteica alterna de buena calidad por su alto contenido proteico y al perfil de AAs adecuado, mostrando buenos resultados cuando es utilizada en dietas formuladas para salmónidos (Storebakken *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2003) y otros peces carnívoros (Day y Placencia-González, 2000). Sin embargo, la harina de soya ha resultado ser deficiente en algunos AAE, principalmente Met (Hardy y Barrows, 2002). En general, se observó una reducción en las tasas de absorción de los AAs cuando se utilizó el hidrolizado proteico de harina de soya, aún y cuando el contenido inicial para ciertos AAs (p. ej. Asp, Leu y Tyr) fuera similar en las soluciones hidrolizadas empleadas. Las bajas tasas de absorción al emplear un hidrolizado de soya pudieron deberse al grado de hidrólisis menor alcanzado con la harina de soya (~17%) que al obtenido con la harina de sardina (~20%). Por

lo tanto, el hidrolizado de soya poseía menos AAs biodisponibles (ya sea en forma de AAs libres o péptidos de bajo peso molecular) que el hidrolizado de sardina. En ensayos de crecimiento con otras especies de peces, también se ha observado resultados adversos al emplear harina de soya como fuente proteica principal (Krogdahl *et al.*, 2003), esto pudiera ser explicado por la baja digestibilidad proteica reportada para la harina de soya, a consecuencia de la presencia de inhibidores de proteasas, principalmente inhibidores tripsinicos, lo cual a su vez y en un efecto de reacción en cadena afecta a la actividad y secreción de las quimiotripsinas por parte de los tejidos pancreáticos (Dabrowski *et al.*, 1989). El calentamiento de la harina de soya es empleado como tratamiento para eliminar en parte a estos inhibidores de enzimáticos y otros compuestos antinutrientes presentes en ella (El-Sayed., 2000), sin embargo, este proceso debe de realizarse adecuadamente para minimizar la perdida de la calidad nutricional de la harina, tal como la perdida de la disponibilidad de la Lys (Francis *et al.*, 2001), la desnaturalización de la proteína por un calentamiento excesivo o la interacción de la proteína con azucares (glucosilación proteica) en reacciones de Mailliard, lo cual reduce la digestibilidad proteica. Por otra parte, otro de los antinutrientes presentes en la soya, son las lectinas o fitohemaglutininas, las cuales son proteínas que se unen a carbohidratos presentes en la membrana del borde de cepillo de los enterocitos para formar complejos glicoconjugados (Francis *et al.*, 2001), afectando el metabolismo intestinal, provocando daño morfológico de los *villi*, incrementando la densidad de las células calciformes (goblets) y una marcada

disminución o ausencia de vacuolas de absorción (Grant, 1991; Van der Ingh *et al.*, 1991).

Las tasas de absorción de AAs fueron relativamente más bajas en la región proximal y media intestinal, en comparación a la distal; sin embargo, se ha observado que los procesos de absorción en una región intestinal específica pueden ser modificados de acuerdo a la fuente de AA empleados y a las necesidades energéticas del intestino. Dicha capacidad del intestino, y en especial de la mucosa, para alterar la absorción de los aminoácidos acorde al sustrato a absorber y las necesidades del organismo, fue discutido por Mailliard *et al.* (1995), quienes mencionan que tales alteraciones en la absorción están reguladas por varios eventos fisiológicos independientes tales como: (1) los sustratos análogos estructurales, los cuales pueden alterar la cinética del transportador y por lo tanto las tasas de absorción; (2) los enterocitos pueden individualmente regular la síntesis *de novo* de transportadores específicos; (3) los sustratos no específicos pueden tener un efecto trófico en la mucosa, y por lo tanto, incrementar el área superficial de absorción; y (4) el transporte paracelular puede incrementarse cuando los transportadores de membrana acoplados al sodio disparan cambios en la permeabilidad de las uniones estrechas.

IV.4 La absorción intestinal del aminoácido libre taurina

Las concentraciones del AA libre Tau fueron significativamente altas en todos los ensayos realizados en el presente estudio, siendo diez veces o más superiores a las tasas de absorción reportadas para el resto de los AAs. Las altas concentraciones de este AA libre indican la importancia fisiológica que posee para el atún aleta azul *T. orientalis*. La Tau no es incorporada a proteínas, pero juega un papel importante en la digestión de las grasas, en la osmoregulación celular, como defensa antioxidante, en la estabilización de las membranas, así como también en el desarrollo de los sistemas visuales, neural y muscular (Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). La Tau es sintetizada a partir de la Cys principalmente por la acción de la enzima L- cisteinasulfinato decarboxilasa (CSD) cuya actividad varía de una especie a otra, aunque en peces tales como el jurel *Seriola quinqueradiata*, el atún aleta azul *T. thynnus* y el barrilete *Katsuwonus pelamis*, la actividad es baja (Yokoyama *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando la actividad de la CSD u otras enzimas que sintetizan normalmente a la Tau están ausentes o su actividad es muy baja, la Tau dietaria se vuelve la principal fuente para el organismo.

La Tau es transportada en la membrana apical de los enterocitos por dos sistemas de transporte (Bröer, 2008), (1) un transportador de alta afinidad Na^+ - y Cl^- -dependiente conocido como transportador TAUT, el cual es capaz de acumular Tau miles de veces en contra de un gradiente; y (2) un transportador de baja afinidad H^+ -dependiente que tiene las propiedades similares a las de un

transportador de iminoácidos y que comparte con el transporte de β -Ala, la Pro, la Gly, la betaina, el ácido α -(methylamino)isobutírico (MeAIB) y el ácido -aminobutírico (GABA). La identificación y caracterización molecular de un transportador de Tau ha sido realizada en el salmón del Atlántico *S. salar* (Zarate y Bradley, 2007) y en tilapia (Takeuchi *et al.*, 2000), observándose un alto grado de similitud, lo que sugiere una gran conservación del transportador. Tomando en consideración los estudios de caracterización enzimática de la CSD en los túnidos y las propiedades de los transportadores intestinales de Tau, aunado a los resultados obtenidos en el presente estudio, se considera que la actividad de los transportadores de Tau en el atún aleta azul *T. orientalis* es elevada. Pero además, gran parte de la Tau cuantificada pudo provenir de depósitos intracelulares que se encuentran presente en los tejidos intestinales, y no obtenida necesariamente de los hidrolizados tras procesos de absorción intestinal o de una conversión de la Cys a Tau *in situ*, pues aún si el atún aleta azul poseyera la ruta de la CSD, esta únicamente se presenta a nivel hepático (Goto *et al.*, 2001), y por lo tanto, no se detectaría empleando la técnica del sistema del intestino invertido. El aporte de Tau a través de los depósitos celulares, quedó confirmado en los ensayos del Capítulo II (Martínez-Montaña *et al.*, 2011) en donde se empleó harina de soya como fuente proteica para la elaboración de los hidrolizados, ya que se detectó una alta concentración de Tau en la mezcla de AAs absorbidos aún cuando el hidrolizado de soya no la contenía.

IV.5 Limitantes del uso del sistema dinámico del intestino invertido para evaluar la absorción intestinal en peces y otros problemas a resolver

Una de las principales desventajas del método del sistema dinámico del intestino invertido, es no distinguir el aporte de las vías de absorción intestinal por difusión de los AAs (p. ej. Rutas transcelulares) de las mediadas por transportadores proteicos. Bakke-McKellep *et al.* (2000) en estudios con salmónidos reportaron que la difusión pasiva es particularmente importante para algunos aminoácidos tales como el iminoácido Pro, los neutros Met y Leu o el ácido Asp. Por otra parte, Nordrum *et al.* (2000) mencionan que la absorción de AAs por medio de mecanismos de difusión aparente es más importante en peces de agua dulce (99 a 88% del total de los AAs absorbidos) que en los marinos (72 a 33% del total de los AAs absorbidos), debido a las diferencias en la permeabilidad de la membrana. Considerando esto y los resultados obtenidos en el ensayo del Capítulo I, se puede inferir que la difusión pasiva es importante en la absorción de los AAs Asp, Leu, Phe y Pro, debido a que sus tasas de absorción se vieron directamente afectadas por la concentración proteica de las soluciones, esto es, a mayor concentración proteica en la solución, mayor absorción, característica propia de los procesos de absorción no saturables independientes de transportadores (Ferraris y Ahearn, 1984). Por lo tanto, es necesario realizar ensayos donde se evalúe el aporte de las rutas no saturables o de difusión pasiva (transporte paracelular y transcelular) a la absorción total de los AAs en el atún aleta azul, pero no solamente en una sola región intestinal, sino a lo largo del tubo

intestinal, ya que se ha observado que la difusión aparente de los AAs varía de una región a otra, o aún dentro de una misma región (Schep *et al.*, 1997; Bakke-McKellep *et al.*, 2000).

De igual manera, son totalmente desconocidos los posibles procesos de absorción de péptidos en el atún aleta azul. Una respuesta para evaluar las tasas de absorción de péptidos en el intestino del atún aleta azul, es el empleo de péptidos estándares tales como los dipéptidos Gly-Gly, Gly-Pro, Gly-sarcosina y carnosina, que se caracterizan por ser relativamente resistentes a la hidrólisis por las peptidasas de borde de cepillo y que se han utilizado ampliamente en la industria farmacéutica para evaluar la absorción de fármacos que mimetizan a los péptidos hidrofílicos (Ganapathy *et al.*, 1994; Walter *et al.*, 1996). Además, resulta necesario realizar una pronta investigación para identificar la expresión de genes de los transportadores peptídicos (PepT1 y/o PepT2) y su distribución a lo largo del tubo intestinal de estos organismos, así como también evaluar la afinidad, especificidad y cinética de absorción de estos mecanismos y su contribución a la absorción total de AAs.

5 Conclusiones

1. La absorción intestinal de aminoácidos (AAs) no esenciales principalmente glucogénicos fue favorecida con relación a los AAs esenciales al emplear hidrolizado de músculo de sardina fresca o de harina de soya en el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Sin embargo, se observó que la biodisponibilidad diferencial de los AAs en los hidrolizados influyó en sus tasas de absorción intestinal.
2. La concentración de la proteína soluble en el hidrolizado, afectó las tasas de absorción para algunos AAs tales como Asp, Leu y Pro, lo que pudiera indicar la importancia de los procesos de absorción no saturables o de difusión pasiva en la absorción total de éstos.
3. El atún aleta azul (*T. orientalis*) posee una alta capacidad de absorción de AAs a lo largo de todo el tubo intestinal, lo que podría ser una adaptación evolutiva para compensar su corta longitud intestinal y tasa de evacuación intestinal rápida.

4. La región proximal es la principal zona intestinal para la absorción de Lys en el atún aleta azul (*T. orientalis*), sin importar la biodisponibilidad de la Lys en el hidrolizado o la fuente proteica.

5. Bajas tasas de absorción intestinal para los AAs fueron observadas al emplearse el hidrolizado de harina de soya en contraste al uso del hidrolizado de músculo de sardina fresca, lo cual pudiera deberse a una baja biodisponibilidad de AAs presente en el hidrolizado debida a una baja digestibilidad de la harina de soya por la presencia de factores antinutricionales o inhibidores enzimáticos.

6. No se observó ningún tipo de interacción en la absorción intestinal entre la Lys y la Arg, aún y cuando la biodisponibilidad de estos AAs catiónicos era diferente en los hidrolizados proteicos.

7. La concentración de la Tau presente en la mezcla de los AAs absorbidos, fue significativamente mayor en todos los ensayos realizados. Sin embargo, la Tau puede provenir de los depósitos intracelulares presentes en los tejidos

intestinales, y no necesariamente de los hidrolizados tras procesos de absorción intestinal o de una transaminación de la Cys.

6 Recomendaciones generales

1. Evaluar la capacidad de absorción y metabolismo de los aminoácidos (AAs) en la región de la masa de ciegos pilóricos en el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) empleando marcadores de gran precisión como son los isotopos radionivelados.
2. Evaluar la posible interacción entre la absorción intestinal proteica con otros nutrientes y compuestos (lípidos, carbohidratos, ligantes, antioxidantes, etc.) que pudieran ser empleados en la elaboración de alimentos formulados para el atún aleta azul (*T. orientalis*).
3. Acoplar el sistema gastrointestinal dinámico del intestino invertido con la técnica de AA marcados con isotopos estables específicos con la finalidad de esclarecer los principales procesos metabólicos que pudieran sufrir algunos de los aminoácidos dietarios durante su paso en la mucosa intestinal.
4. Evaluar el aporte de las rutas no saturables o de difusión pasiva (transporte paracelular y transcelular) a la absorción total de los AAs en el atún aleta azul,

5. Identificar la expresión génica de los transportadores peptídicos y su distribución a lo largo del tubo intestinal de estos organismos, así como también evaluar la afinidad, especificidad y cinética de absorción de estos mecanismos y su contribución a la absorción total de AAs.

6. Esclarecer el origen de la alta concentración de taurina cuantificada en la mezcla de AAs absorbidos y su posible relación en los procesos de absorción proteica en el tracto intestinal del atún aleta azul (*T. orientalis*).

I.7 Literatura citada

- Adibi, S.A. 1997. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology*. 113: 332-340.
- Aguado, F., Martínez, F.J., García-García, B. 2004. *In vivo* total nitrogen and total phosphorus digestibility in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus* Linnaeus, 1758) under industrially intensive fattening conditions in Southeast Spain Mediterranean coastal waters. *Aquaculture Nutr.* 10: 413-419.
- Aguado-Giménez, F., García-García, B. 2005. Growth, food intake and feed conversion rate in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758) under fattening conditions. *Aquaculture Res.* 36: 610-614.
- Alarcón-López, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería, España. 325 pp.
- Altringham, J.D., Block, B.A. 1997. Why do tuna maintain elevated slow muscle temperatures? Power output of muscle isolated from endothermic and ectothermic fish. *J. Exp. Biol.* 200: 2617-2627.
- Awati, A., Rutherford, S.M., Plugge, W., Reynolds, G.W., Marrant, H., Kies, A.K., Moughan, P.J. 2009. Ussing chambers results for amino acid absorption of protein hydrolysates in porcine jejunum must be corrected for endogenous protein. *J. Sci. Food Agric.* 89: 1857-1861.
- Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, Å., Buddington, R.K. 2000. Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 22, 33–44.

- Balimane, P.V., Chong, S., Morrison, R.A. 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharm. Toxicol. Methods.* 44: 301-312.
- Ball, R.O., Urschel, K.L., Pencharz, P.B. 2007. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *J. Nutr.* 137: 1626S-1641S.
- Balocco, C., Bogé, G., Roche, H. 1993. Neutral amino acid transport by marine fish intestine: role of the side chain. *J. Comp. Physiol B.* 163: 340-347.
- Barash, H. 1984. The influence of the lysine level in the diet on nitrogen excretion and the concentration of ammonia in free amino acids in the plasma of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Nutr. Rep. Int.* 29: 283-289.
- Bequette, B.J. 2003. Amino acid metabolism in animals: An overview. En: *Amino acids in animal nutrition*. D'Mello, J.P.F. (Ed.). CAB International Publishing. Wallington, UK. 87-101.
- Berge, G.E., Lied, E., Espe, M. 1994. Absorption and incorporation of dietary free and protein bound (U14C)-lysine in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109 A (3): 681-688.
- Berge, G.E., Sveier, H., Lied, E. 1998. Nutrition of Atlantic Salmo (*Salmo salar*); the requirement and metabolic effect of lysine. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A: 477-485.
- Berge, G.E., Bakke-McKellep, A.M., Lied, E. 1999. In vitro uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture.* 179: 181-193.

- Berge, G.E., Goodman, M., Espe, M., Lied, E., 2004. Intestinal absorption of amino acids in fish: Kinetics and interaction of *in vitro* uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 229: 265–273.
- Bogé, G., Roche, H., Balocco, C. 2002. Amino acid transport by intestinal brush border vesicles of a marine fish, *Boops salpa*. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 131: 19-26.
- Boissen, S., Eggum, B.O. 1991. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple stomach animals, *Nutr. Res. Rev.* 4: 141-162.
- Brill, R. W., Bushnell, P. G. 2001. The cardiovascular system of tunas. In *Tuna: Physiology, Ecology and Evolution, Fish physiology*, vol. 19 (Eds. B. A. Block and E. D. Stevens), pp. 79-120. San Diego: Academic Press.
- Bröer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88: 249-286.
- Buddington, R.K., Chen, J.W., Diamond, J. 1987. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393: 261-281.
- Buddington, R.K., Diamond, J.M. 1987. Piloryc ceca of fish: a “new” absorptive organ. *Am. J. Physiol.* 252 (Gastrointest. Liver Physiol 15): G65-G76.
- Buddington, R.K., Elnif, J., Puchal-Gardiner, A.A., Sangild, P.R.T. 2001. Intestinal aminoacid absorption during development of the pig. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280: R241-R247.
- Carey, F.G., Lawson, K.D. 1973. Temperature regulation in free-swimming bluefin tuna. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A: 375-392.

- Carter, C.G., Bransden, M.P., Van Barneveld, R.J., Clarke, S.M. 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. *Aquaculture*. 179: 57-70.
- Charat, P., Valdez, M. 2008. Systems and Methods for Producing Extruded Fish Product for Use in Fish Farming. United States. Maricultura del Norte, S. de R.L. de C.V. (Ensenada, Mx). 20090011090.
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Usry, J.L. 2003. Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. *Aquaculture*. 218: 553-565.
- Christensen, H.N. 1984. Organic ion transport during seven decades. *Biochem. Biophys. Acta*. 779: 255-269.
- Clarke, S., Smart, A., Van Barneveld, R., Carter, C., 1997. The development and optimization of manufactured feeds for farmed southern bluefin tuna. *Austasia Aquaculture* 11, 59-62.
- Collette, B.B., Nauen, C.E. 1983. Vol. 2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. *FAO fisheries synopsis*. 125 (2): 137.
- Dabrowski, K., Poczyczynski, P., Köck, G., Berger, R. 1989. Effect of partially or totally replacing fishmeal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for endocrine pancreatic secretion. *Aquaculture* 77, 29-49.

- Day, O.J., Placencia-González, H.G. 2000. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Nutr.* 6: 221-228.
- D'Mello, J.P.F. 2003a. Adverse effects of amino acids. En: *Amino acids in animal nutrition*. D'Mello, J.P.F. (Ed.). CAB International Publishing. Wallington, UK. 125-142.
- D'Mello, J.P.F. 2003b. Amino acids as multifunctional molecules. En: *Amino acids in animal nutrition*. D'Mello, J.P.F. (Ed.). CAB International Publishing. Wallington, UK. 1-14.
- Daniel, H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 361-384.
- De-Meer, K., Roef, M.J., Kulik, W., Jakobs, C. 1999. *In vivo* research with stable isotopes in biochemistry, nutrition and clinical medicine: An overview. *Isotopes Environ. Health Stud.* 35: 19-37.
- Del Moral-Simanek, R.J., Vaca-Rodríguez, J.G. 2009. Captura de atún aleta azul en Baja California, México: ¿pesquería regional o maquiladora marina? *Región y sociedad.* XXI (46): 159-190.
- El-Sayed, A.F.M., Martínez, I.N., Moyano, F.J. 2000. Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using *in vitro* assays. *Aquacult. Inter.* 8: 403-415.
- Essed, Z., Fernández, I., Alarcón, F.J., Moyano, F.J. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4): 99-107.

- Fernández, M., Angove, M., Sadawie, T., Cheshire, A. 2007. Dissolved nutrients release from solid wastes of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*, Castelnau) aquaculture. *Aquaculture Res.* 38 (4): 388-397.
- Ferraris, P.B., Ahearn, A.G., 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A* 77 (3): 397–413.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture.* 199: 197-227.
- Ganapathy, V., Brandsch, M., Leibach, F.H. 1994. Intestinal transport of amino acids and peptides. En: Johnson, L.R. (Ed.). *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3ra. Ed. Raven Press, New York. 1773-1794.
- Genty, M., Gonzalez, G., Clere, C., Desangle-Gouty, V., Legendre, J.Y. 2001. Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 223-229.
- Gonçalves, A.F., Castro, L.F.C., Pererira-Wilson, C., Coimbra, J., Wilson, J.M., 2007. Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish? *Comp. Biochem. Physiol. Part. D.* 2: 345-355.
- Goto, T., Tiba, K., Sakurada, Y., Takagi, S. 2001. Determination of hepatic cysteinesulfinatase decarboxylase activity in fish by means of OPA-prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation. *Fisheries Sci.* 67: 553-555.
- Graham, J.B., Dickson, K.A. 2004. Anatomical and physiological specializations for endothermy. En: *Tuna: Physiology, Ecology and Evolution.* Block, B.A. y

- Stevens, E.D. (Eds). Academic Press, San Diego, CA, USA. Fish Physiol Ser. 19: 121–166.
- Grant, G. 1991. Lectins. En: Toxic substances in crops plants. D'Mello, F.J.P., Duffus, C.M., Duffus, J.H. (Eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 49-67.
- Griffin, M.E., Wilson, K.A., Brown, P.B. 1994. Dietary arginine requirement of juvenile hybrid striped bass. J. Nutr. 124: 888-895
- Hakim, Y., Harpaz, S., Uni, Z. 2009. Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. Aquaculture. 290: 110-115.
- Hardy, R.W., Barrows, F.T. 2002. Diet formulation and manufacture. En: Fish Nutrition (Halver, J.E. y Hardy, R.W. eds.), 3rd edn, pp. 505-600. Academic Press, San Diego, CA.
- Heger, J. 2003. Essential to non-essential amino acid ratios. En: Amino acids in animal nutrition. D'Mello, J.P.F. (Ed.). CAB International Publishing. Wallington, UK. 103-124.
- Ikeda, S. 2003. Market and domestic production of cultured tuna in Japan-Cultured tuna in the Japanese market. Cahiers Options Méditerranéennes. 60: 83-84.
- Karasov, W.H., Diamond, J.M. 1983. A simple method for measuring intestinal solute uptake in vitro. J. Comp. Physiol. 152: 105-116.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura H., Simpson, B., Saeki, H. 2006. Trypsins from yellowfin thuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. Comp. Biochem. Physiol. 144B: 47-56.

- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B.K. 2007. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem.* 100: 1580-1589.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M., Baeverfjord, G. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquacult. Nutr.* 9: 361-371.
- Kushak, R., Basova, N. 1988. The absorption of free and "peptide" amino acids in the small intestine of chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 89(3): 317-322.
- Li. P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G. 2009. New development in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids.* 37: 43-53.
- Mailliard, E., Stevens, B.R., Mann, G.E. 1995. Amino acid transport by small intestinal, hepatic and pancreatic epithelia. *Gastroenterology.* 108, 888–910.
- Martínez-Montaño, E., Peña, E., Focken, U., Viana, M.T. 2010. Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): *In vitro* uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture.* 299: 134-139.
- Martínez-Montaño, E., Peña, E., Viana, M.T. 2011. *In vitro* amino acid absorption using hydrolyzed sardine muscle or soybean meal at different intestinal regions of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture nutrition*, Doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00850.x
- Matthews, J.C., 2000. Amino acids and peptide transport systems. En: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, 3–20.

- Matus-de-la-Parra, A., Rosas, A., Lazo, J.P., Viana, M.T. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 223–231.
- Morales, G.A., Moyano, F.J. 2010. Application of an *in vitro* gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture.* 306: 244-251.
- Mourente, G., Tocher, D.R. 2009. Tuna nutrition and feeds: Current status and future perspectives. *Rev. Fisheries Sci.* 17 (3): 373-390.
- Moyano, F.J., Savoie, L. 2001. Comparison of *in vitro* systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 128: 359-368.
- Nordrum, S., Bakke-McKellep, A.M., Krogdahl, Å., Buddington, R.K. 2000. Effect of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 125: 317-335.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Kamaszewski, M., Grochowski, P., Verri, T., Pzepakowska, M., Wolnicki, J. 2010. The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 157: 158-169.
- Ottolenghi, F., Silvestri, C., Giordano, P., Lovatelli, A., New, M.B. 2004. Capture-based aquaculture – The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Rome, FAO. 2004. 308 pp.

- Ottolenghi, F. 2008 Capture-based aquaculture of bluefin tuna. En: Lovatelli, A. y Holthus, P.F. (Eds.). Capture-based aquaculture. Global overview. FAO Fisheries technical paper. No. 508. Rome, FAO. 169-182.
- Pedersen, E., Ito, R. 2010. Marine aquaculture of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in Ensenada, Baja California Mexico: A sustainable approach. World Aquaculture Society. San Diego, CA.
- Peña-Marín, E. 2010. Absorción intestinal de aminoácidos en el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) con el uso de la técnica del intestino invertido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. 59 p.
- Reeds, P.J., Burrin, D.G., Davis, T.A., Stoll, B. 1998. Amino acid metabolism and the energetic of growth. Arch. Anim. Nutr. 51: 187-197.
- Reshkin, S.J., Ahearn, G.A. 1991. Intestinal glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanine transport in a euryhaline teleost. Am. J. Physiol. 260 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 29): R563-R569.
- Robinson, E.H., Poe, W.E., Wilson, R.P. 1984. Effect of feeding diets containing an imbalance of branched-chain amino acids on fingerling channel catfish. Aquaculture. 37: 51-62.
- Rønnestad, I., Gavaia, P.J., Viegas, C.S.B., Verri, T., Romano, A., Nilsen, T.O. Jordal, A.E.O., Kamisaka, Y., Cancela, M.L. 2007. Cloning, tissue expresión and comparative aspects of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) oligopéptido transporter PepT1. J.Exp. Biol. 210: 3883-3896.
- Rosas, A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Shimada, A., D'Abramo, L.R., Viana, M.T. 2008. Comparative intestinal absorption of amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). Aquaculture Nutr. 14 (6), 481–189.

- Rubio-Aliaga, I., Daniel, H. 2008. Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica*. 38 (7-8): 1022-1042.
- Rust, M.B. 2002. Nutritional physiology. En: *Fish Nutrition* (Halver, J.E., Hardy, R.W. eds.), 3rd edn, pp. 367–452. Academic Press, San Diego, CA.
- Santiago-Morales, I.S., Martínez-Montaña, E., Peña-Marín, E., García-Mendoza, E., Viana, M.T. 2009. Evaluación de la absorción de ácido domoico en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) mediante la técnica del saco intestinal invertido. III Taller sobre florecimientos algales nocivos. Laboratorio estatal de salud Pública. Acapulco, Gro. Noviembre, 2009.
- Schep., L.J., Tucker, I.G., Young, G., Butt, A.G. 1997. Regional permeability differences between the proximal and distal portions of the isolated salmonid posterior intestine. *J. Comp. Physiol B*. 167: 370-377.
- Shimada-Borges, J.C., Nogueira-Pressinotti, L., Gomes, V., Machado-Cunha da Silva, J.R. 2010. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fathead (*Centropomus parallelus*, POEY 1860). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386: 39-44.
- Stenberg, P., Luthman, K., Ellens, H., Lee, C.P., Smith, P.L., Lago, A., Elliott, J.D., Artursson, P. 1999. Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity. *Pharmaceutical Res.* 16: 1520-1526.
- Stevens, E.D., McLeese, J.M. 1984. Why bluefin tuna have warm tummies: temperature effect on trypsin and chymotrypsin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 246: 487-494.

- Stoll, B., Henry, J., Reeds, P.J., Yu, H., Jahoor, F., Burrin, D.G. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.* 128: 606-614.
- Storelli C., Vilella, S., Romano, M.P., Maffia, M., Cassano, G. 1989. Brush-border amino acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)*. 257: 506-510.
- Storebakken, T., Shearer, K., Roem, A. 1998. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrated-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 161: 365-379.
- Stowe, R.P., Koenig, D.W., Mishra, S.K., Pierson, D.L. 1995. Nondestructive and continuous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazolium-formazan microemulsion. *J. Microbiol. Meth.* 22: 283-292
- Sylvia, P.C., Belle, S., Smart, A. 2003. Current status and future prospective of Bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) farming in Mexico and the west coast of the United States". *Cahiers Options Méditerranéennes*. 60: 197-200.
- Sylvia, P. 2007. Current Status of Bluefin Tuna Farming in North America. World Aquaculture Society.
- Takeuchi, K., Toyohara, H., Kinoshita, M., Sakaguchi, M. 2000. Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation. *Fish Physiol. Biochem.* 23: 173-182.

- Tanji, M., Kageyama, T., Takahashi, K. 1988. Tuna pepsinogens and pepsins. Purification, characterization and amino-terminal sequences. *Eur. J. Biochem.* 177: 251-259.
- Terova, G., Corà, S., Verri, T., Rimoldi, S., Bernardini, G., Saroglia, M. 2009. Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture.* 294: 288-299.
- Uhing, M., Kimura, R. 1995. The effect of surgical bowel manipulation and anesthesia on intestinal glucose absorption in rats. *J. Clinical Inv.* 95: 2790-2798.
- Van der Ingh, T.S.G.A.M., Kroghdahl, A., Olli, J.J. Hendricks, H.G.C.J.M., Koninks, J.F.J.G. 1991. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, 94: 297-305.
- Verri, T., Kottra, G., Romano, A., Tiso, N., Peric, M., Maffia, M., Boll, M., Argenton, F., Daniel, H., Storelli, C. 2003. Molecular and functional characterization of the zebrafish (*Denio rerio*) PEPT 1-type peptide transporter. *FEBS Letters.* 549 (1-3): 115-122.
- Vilella, S., Ahearn, G.A., Cassano, G., Maffia, M., Storelli. 1990. Lysine transport by brush-border membrane vesicles of eel intestine: interaction with neutral amino acids. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 28): 259: R1181-R188.
- Walter, E., Kissel, T., Amidon, G.L. 1996. The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs. *Adv. Drug. Del. Rev.* 20: 33-58.

- Wang, W.W., Qiao, S.Y., Li, D.F. 2009. Amino acids and gut function. *Amino acids*. 37: 105-110.
- Webb, K.E.J. 1990. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J. Anim. Sci.*, 68, 3011–3022.
- Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.*, 128, 1249–1252.
- Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*. 37: 1-17.
- Yamauchi, K. 2007. Review of a histological intestinal approach to assessing the intestinal function in chickens and pigs. *Anim. Sci. J.* 78: 356-370.
- Yokoyama, M., Takeuchi, T., Park, G.S., Nakazoe, J. 2001. Hepatic cysteinesulphinatase decarboxylase activity in fish. *Aquaculture Res.* 32 (Suppl. 1): 216-220.
- Youdim, K.A., Avdeef, A., Abbott, N.J. 2003. In vitro trans-monomer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug discovery and therapeutics*. 8 (21): 997-1003.
- Zacarias-Soto, M., Muguet, J.B., Lazo J.P. 2006. Proteolytic activity in California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *J. World Aquac. Soc.* 37 (2): 175-185.
- Zarate, J.M., Bradley, T.M. 2007. Molecular cloning and characterization of the taurine transporter of Atlantic salmon. *Aquaculture*. 273: 209-217.
- Zertuche-González, J.A., Sosa-Nishizaki, O., Vaca, J.G., del Moral Simanek, R., Yarish, C., Costa-Pierce, B.A. 2008. Marine Science assessment of Capture-Based Tuna (*Thunnus orientalis*) Aquaculture in the Ensenada

Region of Northern Baja California, Mexico, Final Report of the Binational Scientific Team to the Packard Foundation, Los Altos, CA.