

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA.
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS.**



LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGIA EN ACUACULTURA.

Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de diferentes fuentes proteicas en alimentos extruidos para peces marinos.

Alumna:

Eliza María Flores Salas.

Asesor:

Dr. José Antonio Mata Sotres.

**EVALUACION DE LA DIGESTIBILIDAD in vitro DE DIFERENTES FUENTES
PROTEICAS EN ALIMENTOS EXTRUIDOS PARA PECES MARINOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
BIOTECNOLOGO EN ACUACULTURA

PRESENTA:

ELIZA MARIA FLORES SALAS.

APROBADO POR:

Director de Tesis

Dr. José Antonio Mata Sotres

Dra. Maria Teresa Viana Castrillón
Sinodal

Dr. Fernando Barreto Curiel
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis papás Víctor Manuel Flores Zúñiga y María Elena Salas Reyes, por brindarme el apoyo incondicional a lo largo de mi vida. Gracias a ustedes soy una persona formada en valores con metas y objetivos, los amo.

A mis hermanas Carolina Flores Salas y Victoria Flores Salas, por sus cariños, enojos y risas. Juntas hemos aprendido que no importa las diferencias siempre estaremos unidas.

A David León Nuñez, cierto es que no has estado presente en el desarrollo de mi vida. Pero te quiero dar las gracias por demostrarme que el esfuerzo y la perseverancia dan frutos. Espero en Dios bendiga nuestra vida.

A la Dra. María Teresa Viana Castrillón, por ser mi tutora durante la carrera, por el apoyo y consejos que me brindo para formarme como profesional.

Al Dr. José Antonio Mata Sotres, por brindarme su conocimiento para poder sacar adelante esta Tesis, gracias por los jalones de orejas y por tu amistad.

Al Dr. Fernando Barreto Curiel, gracias por tu amistad dentro y fuera del laboratorio. Fuiste de mucha ayuda en el desarrollo de mi carrera, ¡Gracias!

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), por brindarme un espacio para crear ciencia.

RESUMEN de tesis para obtener el grado de Licenciada en Biotecnología en Acuicultura que presenta Eliza María Flores Salas como requisito parcial para su titulación en la Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. Octubre 2019.

“Evaluación de la digestibilidad in vitro de diferentes fuentes proteicas en alimentos extruidos para peces marinos”

Resumen aprobado por:

Dr. José Antonio Mata Sotres

Debido a la disponibilidad limitada y a la creciente demanda tanto de la harina como el aceite de pescado, los precios de estos ingredientes aumentan constantemente impulsando la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas y de lípidos, tanto animales como vegetales de origen terrestre. Sin embargo, esas fuentes alternativas carecen de ciertos nutrientes claves como las proteínas y vitaminas indispensables para un crecimiento adecuado de los organismos y al mismo tiempo presentan bajas digestibilidades lo que dificulta la completa sustitución por ingredientes alternativos. Por lo tanto, en la presente tesis se pretende evaluar el efecto en la digestibilidad de alimentos formulados sin harina de pescado usando fuentes alternas de proteína. Se formularon 3 dietas experimentales P100 (100% pulpa de pollo), E100 (100% Ensilaje) y 66-33 (66% pulpa de pollo y 33% ensilaje). Cada una de estas dietas fueron elaboradas por el proceso de extrusión. Los estudios de digestibilidad, se llevaron a cabo con extractos enzimáticos obtenidos directamente de páncreas de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). No se presentaron diferencias significativas en la composición proximal de los alimentos ni en la digestibilidad, esto al ser comparadas con un pez entero (sardina). El hallazgo más interesante de la presente tesis fue la comprobación de que fuentes terrestres como la pulpa de pollo, pueden ser utilizados como alternativa a la harina de pescado en la formulación de alimentos acuícolas.

Palabras Clave: *Digestibilidad, pulpa pollo, ensilaje, Thunnus orientalis*

Índice General

1. Introducción. ¡Error! Marcador no definido.
 - 1.1. Sustitución de harina de pescado ¡Error! Marcador no definido.
 - 1.1.1. Subproductos de ave..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 1.1.2. Hidrolizados..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 1.2. Digestibilidad de los alimentos ¡Error! Marcador no definido.
2. Hipótesis..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 3.1. Objetivos específicos. ¡Error! Marcador no definido.
4. Materiales y métodos..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.1. Obtención del extracto crudo pancreático... ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.2. Formulación de las dietas experimentales .. ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.3. Análisis Proximales ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.3.1. Humedad..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.3.2. Porcentaje de Proteína..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.3.4. Contenido de Cenizas ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.4. Análisis de digestibilidad aparente “*in vitro*”. ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.4.1. Digestibilidad “*in vitro*”. ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.4.2. Determinación de Cenizas insolubles... ¡Error! Marcador no definido.
 - 4.5. Estadística..... ¡Error! Marcador no definido.
5. Resultados..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 5.1. Composición proximal..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 5.2. Digestibilidad *in vitro* ¡Error! Marcador no definido.
6. Discusión..... ¡Error! Marcador no definido.
7. Conclusiones ¡Error! Marcador no definido.
8. Bibliografía..... ¡Error! Marcador no definido.

Índice de Cuadros

Cuadro I. Formulación basal para las diferentes dietas	9
Cuadro II. Composición de los diferentes tratamientos experimentales	10
Cuadro III. Análisis proximal de las diferentes dietas y tratamientos	16
Cuadro IV. Digestibilidades “ <i>In vitro</i> ” de los diferentes ingredientes y tratamientos experimentales.	24

1. Introducción.

Actualmente en el mundo viven aproximadamente más de 7 billones de personas, se espera que para el 2030 esta cifra alcance los 8.5 billones, mientras que en el 2050 se proyecta una población mundial de 9.7 billones de personas (FAO, 2015). Este crecimiento exponencial en la población dará origen a un mayor incremento en la demanda de alimento de origen animal (FAO, 2016). En donde actividades como la pesca y la acuicultura jugarán un papel muy importante en el abastecimiento de este producto. La pesca en los últimos años se ha mantenido estancada con la producción anual que oscila entre los 80 a 90 millones de toneladas, mientras que la acuicultura ha ido en aumento (FAO, 2015). En el 2015, la producción acuícola fue aproximadamente 78 millones de toneladas métricas (FAO, 2016).

La acuicultura es una de las técnicas de producción de alimento para el consumo humano más importantes y con mayor crecimiento en los últimos años. Desde 1984, la maricultura a nivel mundial tuvo una tasa de crecimiento anual del 15%. Siendo que la producción acuícola de peces marinos representó el 1.98% de la producción total en 1998, en donde el valor económico fue de 6.47% de la producción mundial, dejando en claro su gran importancia económica (FAO, 2000).

En México la acuicultura tiene un gran potencial, debido a las características tanto geológicas y oceanográficas presentes en algunas regiones de las costas, además del desarrollo de investigación y tecnología. CESAIBC (2016), menciona que Baja California ha sido precursora del cultivo de varias especies marinas, como lo es el cultivo de lobina rayada (*Morone saxatilis*), el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*), la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y el jurel (*Seriola dorsalis*).

Para poder impulsar esta actividad y practicarla en diferentes regiones del mundo, es necesaria una investigación sobre la formulación de alimentos balanceados para peces. Logrando así una reducción sobre la presión del recurso silvestre, pero al mismo tiempo satisfaga los requerimientos nutricionales específicos de cada especie, para obtener un óptimo desarrollo, crecimiento, reproducción y salud (FAO, 2014). En la

actualidad, la acuicultura depende en gran medida de la harina y aceite de pescado para la formulación de alimento balanceado (Tacon y Metian, 2015). La harina de pescado es una fuente proteica de alta calidad con un perfil adecuado de aminoácidos y al mismo tiempo presenta una alta digestibilidad (Tacon y Metian, 2015).

El aceite de pescado es rico en energía digestible y ácidos grasos esenciales, lo que lo hace sumamente importante, puesto que, su presencia favorece al desempeño y salud fisiológica de los peces (Turchini et al., 2007). Como estos ingredientes son obtenidos mediante las pesquerías, no se logran obtener las cantidades necesarias para satisfacer la demanda para el consumo humano, ni para la industria de harina y aceite de pescado (FAO, 2004, 2015). Debido a esta situación, los precios de estos ingredientes van en constante aumento, impulsando la búsqueda de fuentes alternas de proteínas y de lípidos.

De la producción de peces marinos a través de la acuicultura, el 60% de los costos de producción se relacionan con aspectos referentes a la alimentación por su alto nivel de proteína (i.e. 40-50% proteína cruda) en las dietas de los peces. Desde hace varios años se ha buscado una dieta con alto contenido proteico, pero bajo costo para poder así reducir los costos de producción.

Para lograr este objetivo, se evalúan dietas formuladas en condiciones de cultivo controladas durante un tiempo determinado registrando supervivencia, ganancia de peso y digestibilidad. Sin embargo, estos procedimientos son de alto costo y muy tardados (Grabner, 1985).

Los alimentos elaborados bajo un procedimiento de extrusión facilitan reacciones que en ocasiones se encuentran limitadas por las características y reactivos utilizados en el alimento, debido a la ruptura y mezclado estructural. La extrusión es un proceso de cocción rápida, continua y homogénea; donde se involucra la energía térmica y mecánica, produciendo alta presión y temperatura (100- 180°C) en un tiempo breve (Industrias alimentarias, 2008).

1.1 Sustitución de harina de pescado.

Debido al incremento constante de la población, se estima que para el 2020 se necesitaran de 71 toneladas métricas de alimento para la acuicultura, donde la harina de pescado seguirá siendo el principal ingrediente para alcanzar dichos volúmenes. Sin embargo, aunque la producción acuícola se incremente al mismo ritmo que la demanda de la producción, la harina de pescado seguirá siendo la principal limitante, debido a la reducción de las capturas pesqueras y los altos costos para el abastecimiento de esta (FAO, 2012., Mata-Sotres et al., 2018).

Es por esto que en las últimas décadas se han realizado una gran cantidad de estudios por parte de distintas instituciones para reducir la dependencia por la harina de pescado (HP) en la acuicultura. Estudios de los ingredientes alternativos, han aportado gran conocimiento sobre los requerimientos nutricionales de las diferentes especies, así como la calidad de los diferentes ingredientes que se han utilizado (FAO, 2012). En 1997, se realizó un experimento con juveniles de corvina dorada en donde se formuló una dieta con harina de soya para la sustitución de HP. En este experimento realizado por McGoogan y Gatlin (1997), reportaron que hubo un crecimiento similar en las dietas formuladas con harina de soya y la HP, en donde se obtuvo un 90% y 100% respectivamente.

También en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se obtuvieron resultados favorables con la sustitución del 2%5 y 33% de HP por harina de soya, hojas de altramuz y guisantes. En donde no se presentó ninguna diferencia de peso entre las distintas dietas (Carter y Hauler, 2000).

1.1.1. Subproductos de ave.

Dentro de los ingredientes que se han evaluado, destacan los subproductos de la industria avícola, los cuales se consideran de gran importancia para la acuicultura debido a su buen perfil de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales (NRC, 2011; Mata-Sotres et al., 2018). Además, hay una disponibilidad constante de estos

subproductos en el mercado y presentan un precio significativamente menor que la harina de pescado; lo que permite que se incorpore en grandes cantidades en los alimentos para organismos acuáticos (NRC, 2011).

Se ha sustituido 35%, 70% y 100% la HP con subproducto de ave en dietas de híbrido la lobina rayada (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) y no se encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso entre los organismos alimentados con diferentes dietas (Rawles et al., 2006).

1.1.2. Hidrolizados.

El objetivo de la elaboración de hidrolizados proteicos, es solubilizar la fuente proteica en aminoácidos y péptidos, lo que aumenta el valor nutricional y biológico del producto, siendo un producto con valor agregado en comparación a la proteína original (Bijoy, Sabu, y Harikrishnan, 2018; Haider et al., 2017). El emplear proteína de pescado para hidrolizar, es muy atractivo pues además de que se mantiene el valor nutritivo de la proteína, se utilizan subproductos de la industrial que generalmente son descartados (Sathivel et al., 2003). Se han reportado subproductos equivalentes al 40% del peso de los organismos, los cuales pueden llegar a ser utilizadas como fuentes proteicas (Roman-Gavilanes et al., 2015).

1.2. Digestibilidad de los alimentos.

En el momento que el alimento es consumido la hidrólisis, rompimiento y liberación de los nutrientes que se encuentran en la dieta, y la absorción de estos engloban el proceso de digestión y asimilación, mejor conocido como la digestibilidad de la dieta. Este proceso se lleva a cabo en el estómago e intestino, en donde las enzimas digestivas son las encargadas de llevar acabo el rompimiento de enlaces que unen a las unidades básicas que constituyen los nutrientes (aminoácidos, ácidos grasos, etc). Una dieta puede contener todos los requerimientos nutritivos de una especie, pero si no presenta la forma adecuada para la digestión, esta no va a poder ser asimilada (Cordova-Murueta, 2002).

Usualmente se utiliza la digestibilidad *in vivo* para poder evaluar la digestibilidad de los nutrientes en los ingredientes o dietas. Una desventaja de esta técnica es que suele ser muy laboriosa y los resultados pueden variar a raíz de diversos factores ambientales o metodológicos (Lazo et al., 1998). Mientras que la digestibilidad *in vitro* es una técnica utilizada para seleccionar ingredientes altamente digestibles. En donde se obtienen resultados de una manera rápida sobre la digestibilidad del ingrediente y su efecto en las enzimas digestivas del organismo (Alarcón, 2002). Actualmente la evaluación de la digestibilidad de los nutrientes de ingredientes que ayudan a conformar una dieta para peces marinos, han sido poco evaluados.

Por lo tanto, el presente estudio evalúa la digestibilidad *in vitro* de diversos ingredientes para lograr formular así dietas adecuadas para la engorda de juveniles de peces marinos con gran potencial de producción en costas mexicanas.

2. Hipótesis.

La sustitución de harina de pescado por subproductos de ave (pulpa de pollo) y ensilajes en la elaboración de alimentos extruidos para peces marinos no afectará la digestibilidad "*in vitro*" de dichos organismos.

3. Objetivo general.

Determinar la digestibilidad *in vitro* de diferentes fuentes proteicas en alimentos extruidos para peces marinos.

3.1. Objetivos específicos.

- Determinar los niveles de lípidos, proteínas, humedad y cenizas de las diferentes harinas utilizadas en la elaboración de las dietas.
- Determinar los niveles de lípidos, proteínas, humedad y ceniza de las diferentes dietas experimentales.
- Evaluar la digestibilidad *in vitro*, de las diferentes dietas utilizando un extracto pancreático de atún aleta azul del Pacífico.

4. Materiales y métodos.

4.1. Obtención de extracto crudo pancreático.

Las vísceras de atún aleta azul del Pacífico fueron proporcionadas por el rancho atunero Baja Aqua Farms, S.A. de C.V. Ensenada B.C. Los tejidos fueron tomados en fresco directamente en una cosecha, mismos que fueron trasladados en un contenedor refrigerado de 20 litros al laboratorio de Nutrición y Fisiología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la UABC. Posteriormente se almacenaron los páncreas a -80 °C hasta su uso. Para la obtención del extracto crudo se seleccionaron 300 g de páncreas de cinco organismos, se homogenizaron con un triturador manual en una solución fría de NaCl al 10% en una relación de 1:2 (páncreas/ solución salina). Esta mezcla se centrifugó a 10,000 g, durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, “extracto crudo”.

4.2. Formulación de las dietas experimentales.

A continuación, se muestra la formulación que sirvió como base para los diferentes tratamientos (Cuadro I). Cabe mencionar que los demás ingredientes añadieron directamente como *slurry* durante el proceso de extrusión para así tener 3 diferentes dietas experimentales (Cuadro II).

Cuadro I. Ingredientes utilizados para la formulación de las diferentes dietas experimentales

INGREDIENTE	%
Harina de Pollo	65.6
Harina de trigo	14.7
Almidón	6
Gelatina	6
Glicerina	1.5
Benzoato de Na	0.4
BHT	0.01

Cuadro II.- Composición de los diferentes tratamientos experimentales.

TRATAMIENTOS	COMPOSICIÓN
--------------	-------------

66-33	66% de pulpa de pollo y 33% ensilaje.
P100	100% pollo.
E100	100% Ensilaje.

4.3. Análisis proximales.

Se realizaron análisis proximales tanto de los organismos completos como de las diferentes dietas formuladas para determinar la cantidad de humedad, proteínas, lípidos y cenizas. La composición bioquímica de las dietas se realizó por triplicado siguiendo las metodologías propuestas por la “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995).

4.3.1. Humedad.

El contenido de humedad se calculó utilizando el método gravimétrico, en donde se colocaron en navecillas de aluminio por triplicado, 2 g de cada una de las dietas experimentales (previamente pulverizadas). Posteriormente, se colocaron dentro de una estufa durante 4 horas a una temperatura de 100 °C. A continuación, las muestras fueron colocadas dentro de un desecador para su enfriamiento hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Su peso seco fue registrado hasta fue constante. El cálculo del porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia de pesos.

4.3.2. Porcentaje de proteína.

Para determinar el porcentaje de proteína cruda en cada una de las dietas se utilizó el método de Micro-Kjeldahl. Para ello en el proceso de digestión se usaron 2 g de Sulfato de potasio, 40 mg de sulfato cúprico con 50 mg de muestra (dieta previamente pulverizada) y 3 ml de ácido sulfúrico durante cuatro horas en un digestor. Una vez digeridas las muestras (mostrando un color azul cristalino), se aforaron a un volumen 25 ml en un matraz volumétrico de 25 ml para su posterior destilación.

En la destilación, se utilizaron 50 ml de hidróxido de sodio al 35%, 25 ml de muestra previamente digerida y aforada con agua destilada y 30 ml de ácido bórico al 4%, con una solución indicadora de pH (solución madre; 10 ml de Verde de bromocresol y 7 ml de Rojo de metilo en 1,000 ml de ácido bórico al 4%). El resultado de la destilación

fue condesado y retenido en una cámara de reacción, donde se tituló automáticamente con ácido clorhídrico al 0.02 N. El proceso de destilación y titulación se realizó con titulador automático (VELP Scientifica, UDK-169). Este equipo cuenta con una precisión de ± 1 %. El porcentaje de proteínas en las dietas se estimó mediante un factor establecido de 6.25 de acuerdo a la AOAC (1995) para las harinas de procedencia animal.

4.3.3. Lípidos totales.

El contenido de lípidos totales fue calculado gravimétricamente de acuerdo a la técnica de Soxhlet (AOAC, 1995), utilizando éter de petróleo como medio de arrastre. En donde se pesaron los matraces bola antes de iniciar, se prepararon cartuchos con filtros Wattman, en donde se colocaron 2 g de cada una de las dietas a analizar, todo se realizó por triplicado.

Una vez hechos los cartuchos se procedió a hacer el arrastre con el éter de petróleo durante 4 horas. Al término de las 4 horas los cartuchos se remueven y el exceso del petróleo se recuperó a su envase. Los matraces se mantuvieron durante 24 horas en una estufa a 60 °C para eliminar el resto de éter tanto en el matraz como en los cartuchos. A las 24 horas los matraces y los cartuchos fueron pesados nuevamente y se determinó el porcentaje de lípidos en las dietas experimentales. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

4.3.4. Contenido de cenizas.

El valor promedio del contenido de cenizas fue calculado por gravimetría calcinando las diferentes muestras de las dietas a 550 °C por un periodo cinco horas. Al término de las cinco horas se colocaron en un desecador y nuevamente fueron pesadas y a partir de la diferencia en el peso, se calculó el porcentaje de ceniza.

4.4. Análisis de digestibilidad aparente “*in vitro*”

4.4.1. Digestibilidad “*in vitro*”

Para una correcta aproximación del proceso de digestión que se produce en los organismos, se realizó una digestión “*in vitro*” la cual constó de una etapa acida seguida de una etapa alcalina, basándonos en la metodología propuesta por Adler-Nissen (1976). Mientras que para la realización de la digestión ácida, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se colocaron 2 gr de proteína en 100 ml de agua desionizada. Con una solución de 1 N de HCl se ajustó el pH a 2 y se incubó el matraz durante 30 min a 37 °C sobre una plancha de calentamiento. Se colocó la pepsina porcina (P-7012, SIGMA®) en una concentración de 12.5 U/mg de proteína y se mantuvo en agitación constante con ayuda de un agitador magnético (85 rpm); se incubó por 60 min a 37 °C en baño maría. En donde cada 10 min se media y ajustaba el pH.

Transcurrida la digestión ácida, se detuvo la reacción ajustando el pH a 8 con ayuda de una solución a 1 N de NaOH. Para realizar la digestión alcalina, se añadieron 10 ml de extracto de pancreático de atún y posteriormente se pasó a un baño maría a 37 °C por 180 min en donde cada 15 min se ajustaba el pH. Posteriormente se pasó a un baño maría a 95 °C durante 20 min para desactivar la hidrólisis en los matraces. Finalmente, se centrifugó el sobrenadante de los matraces a 10,000 g por 10 min a 4 °C, se recolectó el precipitado con ayuda de una espátula y se colocó en una navecilla metálica para ponerla a secar a 100 °C por 24 h. Transcurridas las 24 h, se determinó el peso seco para cada una de las muestras. Se realizó un blanco sin proteína y HCl (sin pepsina ni extracto enzimático de atún).

4.4.2. Determinación de cenizas insolubles.

Se recuperaron los sólidos (heces) de cada uno de las diferentes dietas experimentales y estos fueron calcinados. Las cenizas resultantes ya pesadas fueron llevadas a ebullición en una solución de HCl 2 N, utilizando filtros GSF. Las cenizas resultantes tras el lavado fueron nuevamente calcinadas y pesadas a peso seco constante. Las cenizas obtenidas corresponden a las cenizas insolubles en acido.

El coeficiente de digestibilidad aparente se calculó como se describe en la siguiente formula:

$$DA (\%) = 100 - (100 * \% \text{ de CIA en el alimento} / \% \text{ de CIA en heces}).$$

4.5. Estadística.

Los resultados se sometieron a un análisis de ANOVA de una vía, seguidas de una prueba de Tukey en caso de haber diferencias significativas. Para todos los casos, se determinó un nivel de significancia de de 0.05 ($p < 0.05$).

5. Resultados.

5.1. Composición proximal.

Como se muestra en la Cuadro III, el ingrediente que presento una mayor cantidad de proteína fue el Pez (56.3 ± 1.0), y el que presento una menor cantidad significativa ($p < 0.05$) fue Ens (18.0 ± 0.7). En el caso de las dietas, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos experimentales, siendo E100 (50.7 ± 0.6) la dieta que presentó una mayor concentración de proteína

Para el caso de los lípidos, el ingrediente con una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$) de lípidos fue el de Pulpa (48.6 ± 0.2), siendo la dieta de Ensilaje (18.0 ± 0.7) el que presento la menor cantidad de lípidos. De igual manera no hubo diferencia entre los diferentes tratamientos experimentales, siendo la dieta E100 la que registro un mayor de lípidos (19.6 ± 0.09) (Cuadro III).

En relación a la humedad, Ens (4.87 ± 1.18) presentó un contenido significativamente mayor en relación a los otros ingredientes ($p < 0.05$), sin haber diferencias entre los otros dos ingredientes. En relación a la humedad de los tratamientos, no se observó diferencias significativa entre ellos, siendo 66-33, el que presento mayor humedad con $2.54 \pm 1.07\%$ (Cuadro III).

El ingrediente Ens (11.0 ± 1.8) obtuvo una cantidad alta en cenizas, mientras que la pulpa (6.6 ± 0.5) registro la menor cantidad. La dieta con mayor cantidad de cenizas fue la E100 (9.3 ± 1.3), siendo 66-33 (8.4 ± 1.9) la de menor contenido. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas ($p = 0.38$) (Cuadro III).

Cuadro III. Análisis proximal de las diferentes dietas y tratamientos.

Análisis	Pez	Ens	Pulpa	66-33	P100	E100
Proteína	57.7 ± 1.0a	20.9 ± 0.07c	49.4 ± 1.28b	53.9 ± 0.53ab	53.37 ± 0.9ab	50.7 ± 0.6ab
Lípidos	26.7 ± 0.3b	18.0 ± 0.7c	48.6 ± 0.2a	19.3 ± 0.1c	19.3 ± 0.2c	19.6 ± 0.0c
Humedad	0.75 ± 0.1b	4.87 ± 1.18a	1.68 ± 0.5b	2.54 ± 1.07ab	1.16 ± 0.14b	2.02 ± 1.35b
Cenizas	10.7 ± 1.3	11.0 ± 1.8	6.6 ± 0.5	8.4 ± 1.9	8.2 ± 0.3	9.3 ± 1.3

Ingredientes:

Pez: pez entero.

Ens: Ensilaje.

Pulpa: Pulpa de pollo.

Tratamientos:

66-33:66% de pulpa de pollo y 33% ensilaje.

P100:100% pollo.

E100:100% Ensilaje.

5.2. Digestibilidad *in vitro*.

En el Cuadro IV, se pueden observar las diferentes digestibilidades obtenidas a partir de los diferentes ingredientes y dietas experimentales. En donde para los ingredientes Pez obtuvo la mayor digestibilidad (90.34 ± 3.97). Mientras que para los tratamientos se observan valores muy similares para P100 y E100 con 89.34 ± 2.37 y 89.50 , respectivamente. Para ninguno de los casos se observa diferencia significativa ($p = 0.15$). Además, cabe mencionar que para P100 y E100 se realizaron blancos para ajustar los valores, teniendo como resultado valores de BP100 con 91.82 y BE100 con 91.73 . Para el caso del Ens no se reportan datos ya que por un error metodológico se dirigió toda la muestra.

Cuadro IV. Digestibilidades “*In vitro*” de los diferentes ingredientes y tratamientos experimentales.

Muestra	Digestibilidad
Pez	90.34±3.97
Ens	---
Pulpa	78.92±8.68
66-33	86.65±5.65
P100	89.34±2.37
E100	89.50

Ingredientes:

Pez: pez entero.

Ens: Ensilaje.

Pulpa: Pulpa de pollo.

Tratamientos:

66-33: 66% de pulpa de pollo y 33% ensilaje.

P100:100% pollo.

E100:100% Ensilaje.

6. Discusión.

Debido al continuo incremento de la población y la disponibilidad limitada de los productos de las pesquerías, con el respectivo incremento en la demanda de la harina como del aceite de pescado, ha generado que los precios de estos ingredientes aumentan constantemente. Es por esto que las investigaciones recientes se han enfocado en la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas y de lípidos (Bell et al., 2001; Fuentes-Quesada et al., 2018; Mata-Sotres et al., 2018; Rombenso et al., 2017). Sin embargo, esas fuentes alternativas carecen de cierto nutrientes claves, malas digestibilidades e inclusive pueden llegar a causar enfermedades, lo que se refleja en el bienestar de los organismos en cultivo (Fuentes-Quesada et al., 2018; Gu et al., 2016).

Los peces marinos, que en su gran mayoría son carnívoros estrictos, requieren dietas con niveles proteicos altos que se deben de mantener entre un 40% a 60%, mientras los niveles de lípidos, se deben de mantener en un rango de entre el 6% al 15%, esto favorece al óptimo crecimiento del organismo (Abdo de la Parra, et al., 2018). En el presente experimento, todos los tratamientos experimentales (66-33, P100 y E100), presentaron valores de proteína superiores al 50%, sin tener diferencias significativas con el contenido de proteína del Pez, lo que nos indica la buena calidad nutricional de cualquiera de los tratamientos. De la misma manera, en relación al contenido de lípidos, no se encuentra diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos experimentales y el Pez, teniendo contenidos cercanos al 19%. Estos resultados, aunados a los de humedad y cenizas, nos sugieren que cualquiera de los tratamientos experimentales, ya sea 66-33, P100 o E100, se le podría suministrar a organismos vivos, sin tener problemas de desnutrición aparente.

Para que un ingrediente pueda ser implementado en la formulación de dietas destinadas para la acuicultura, es indispensable analizar su composición química, palatabilidad y la digestibilidad de los nutrientes presentes en ella (Glencross et al., 2007). Cabe de destacar que la evaluación de la digestibilidad es la que nos indica que porcentaje del alimento es aprovechado por el organismo, en este caso el pez (Lin et al.

2004). La digestibilidad de un ingrediente se puede evaluar de manera *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, uno de los principales problemas es que para realizar la digestibilidad *in vitro* en peces generalmente se utilizan métodos que fueron diseñados para animales terrestres (Moyano et al., 2014). Lo que genera problemas de interpretación muy grandes ya que cada organismo tiene características específicas en su fisiología digestiva. Sin embargo, grandes avances se han generado en la descripción de la bioquímica de las proteasas digestivas, capacidades digestivas y calidad de los ingredientes de los alimentos formulados para peces marinos (Castillo-Lopez, et al., 2016; Mata-Sotres et al., 2016; Román-Gavilanes et al., 2015).

La importancia de los datos obtenidos en las digestibilidades, es que nos indican el porcentaje de alimento que pudiera ser absorbido por el organismo. Dichos datos son esenciales para lograr formulaciones con un alto valor nutricional y bajo impacto ambiental (Lin et al. 2004). En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en las digestibilidades entre ninguno de los tratamientos, sin importar si tenía inclusión de pollo o ensilaje. Además, tampoco se encontraron diferencias significativas entre la digestibilidad del pez (sardina) con ninguno de las dietas experimentales.

Durante la digestión, la pepsina hidroliza los enlaces peptídicos que implican fenilalanina, tirosina y leucina, mientras que la tripsina actúa en el lado carboxilo de la lisina y la arginina (Castillo-Lopez et al., 2016; Román-Gavilanes et al., 2015). Se ha reportado que la tripsina representa el 89% de las proteasas alcalinas del páncreas de *T. orientalis*, mientras que la quimiotripsina representaba el 3% de las proteasas alcalinas, al utilizar harina de pescado como sustrato (Román-Gavilanes et al., 2015). Por lo tanto, aunque no se ha medido directamente, podemos inferir que la composición de aminoácidos de la pulpa de pollo es adecuada para que las enzimas del páncreas de los peces marinos la puedan digerir correctamente. Además, el extracto crudo pancreático que se utilizó provenía de organismos destinados para la acuicultura los cuales eran alimentados con sardina fresca. Esto pudo favorecer a la completa digestión de la muestra de Ensilaje, puesto que este proceso de predigestión, ayuda a la máxima

conservación del valor nutricional (León, 2003). Además resultados similares se han observado al utilizar ensilajes tanto en especies de agua dulce (*Labeo rohita*) como en crustáceos (*Macrobrachium rosenbergii*) (Bijoy et al., 2018; Haider et al., 2017).

Al igual que en el presente trabajo, el uso de subproductos de ave han dado resultados similares en digestibilidad en otras especies de peces (Gutiérrez-Espinosa et al., 2011). Sin embargo, en nuestro caso hemos utilizado pulpa de pollo en lugar de harina de ave, lo que nos garantiza que los nutrientes proporcionados sean de mejor calidad, ya que en mayoría de los casos la harina de ave se compone en gran parte de ingredientes como plumas y huesos.

7. Conclusiones.

Los resultados obtenidos en la presente tesis contribuyen al estudio de nuevos ingredientes para la sustitución de ingredientes de origen marino. Si bien el uso de ensilaje a partir de subproductos de la pesca presentó una composición proximal y una digestibilidad similares al Pez entero, lo que favorecería su utilización en formulaciones, no deja de depender de los productos provenientes de la pesca.

Por lo tanto, la aportación principal de la presente tesis es la comprobación que fuentes terrestres pueden ser utilizados como alternativa a productos marinos en la formulación de alimentos acuícolas. Ya que la pulpa de pollo además de ser un subproducto de la industria avícola, presentó un perfil nutricional adecuado y una apropiada digestibilidad por parte de las enzimas pancreáticas provenientes de peces marinos, en este caso el atún de aleta azul.

8. Bibliografía:

- Abdo de la Parra, M., Rodriguez Ibarra, L., Hernandez, C., Hernandez, K., Gonzales Rodriguez, B., Martinez Rodriguez, I., & Garcia Ortega, A. (2018, Agosto). Efecto de diferentes niveles de proteina y lipidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Retrieved from efecto de diferentes niveles de proteina y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-19572010000300008&script=sc>
- Adler-Nissen J. 1976. Enzymatic hydrolysis of protein for increased solubility. Journal Agricola of Food and Chemistry 24, 1090-1093.
- Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Alarcón, F.J., Moyano y M. Díaz. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-Stat system. J. of the Sci. of Food and Agric. 82:1-8.
- aquaculture 2015*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, The Food an
- Bell.,J.G. McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2001. Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in Diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid Metabolism. J. Nutr. 131, 1535–1543. doi:10.1093/jn/131.5.1535
- Bijoy, V.M., Sabu, S., Harikrishnan, M., 2018. Fish meal replacement with squilla (*Oratosquilla nepa* , Latreille) silage in a practical diet for the juvenile giant freshwater prawn , *Macrobrachium rosenbergii* de man, 1879. Aquac. Int. 1229–1245.

- Carter., Hauler. 2000. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for atlantic salmon, *Salmon salar* L.
- Castillo-Lopez, E., Espinoza-Villegas, R.E., Viana, M.T., 2016. In vitro digestion comparison from fish and poultry by-product meals from simulated digestive process at different times of the Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture* 458, 187–194. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.011
- Castillo-Lopez, E., Espinoza-Villegas, R.E., Viana, M.T., 2016. In vitro digestion comparison from fish and poultry by-product meals from simulated digestive process at different times of the Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture* 458, 187–194. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.011
- CESAIBC (Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California). 2016. Directorio de Productores de Peces. Recuperado de: <http://www.cesaibc.org/sitio/directorio.php>
- Córdova-Murueta, J. H., García-Carreño F. L., 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*
- FAO. (Food and Agriculture Organization). 2000. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, 2000.
- FAO. (Food and Agriculture Organization). 2012. El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, 2012.
- FAO. (Food and Agriculture Organization). 2014. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, 2014.

- FAO. (Food and Agriculture Organization). 2015. Food outlook: biannual report on global food market. FAO Fisheries and Aquaculture Department. The Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- FAO. (Food and Agriculture Organization). 2016. *The state of world fisheries and*
- Fuentes- Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso, A.N., Guerrero- Renteria, Y., Nomura- Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J.P., Mata-Sotres, J.A., 2018. Enteritis induction by soybean meal in Totoaba macdonaldi diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture* 495, 78–89. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.05.025
- Glencross, B.D.; Booth, M.; Allan, G.L. A feed is only as good as its ingredients – A review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition*, V.13, p.17- 34, 2007. doi: 10.1111/j.1365- 2095.2007.00450.x.
- Grabner. M. 1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of feed components. *Aquaculture* 48, 97-110
- Gu. M., Bai, N., Zhang, Y., Krogdahl, A., 2016. Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. *Aquaculture* 464, 286–295. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.06.035
- Gutiérrez-Espinosa, M.C., Yossa-perdomo, M.I., Vásquez-Torres, W., 2011. Digestibilidad aparente de materia seca , proteína y energía de harina de vísceras de pollo , quinua y harina de pescado en tilapia nilótica , *Oreochromis niloticus* Apparent digestibility of dry matter , protein and energy regarding fish meal , poultry by. Grup. Investig. Granac, Inst. Acuic. Univ. Los Llanos, Colomb. 15, 169–179. doi:10.22579/20112629.16

- Haider, M., Ali, Z., Abbas, S., Naseem, A., Ahmad, M., Kamal, S., Afzal, M., 2017. Fatty acid profile and effect of fish fermented silage on digestive enzymes in *Labeo rohita*. *Biosci. J.* 33, 1562–1571.
- Industrias alimentarias. 2008. La página de la industria alimentaria. Perú. Recuperado de <http://industrias-alimentarias.blogspot.com/2008/03/qu-son-los-alimentos-extrudos.html>
- Lazo, J.P., R. Mendoza., Holt, G.J., Aguilera C. 1998. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *J. of World Aquaculture Society*. 29 (4):441-450
- León L. F. J. (2003). Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de gramíneas tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería. MS Tesis, Universidad de Puerto Rico, RUM. 63pp. <http://grad.uprm.edu/tesis/leonalamo.pdf>
- Lin H, Liu Y, Tian L, Wang J, Zheng W, Huang J, Chen P. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of the World Aquaculture Society* 2004; 25: 134-142.
- Mata-Sotres, J.A., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M., 2016. Daily rhythms of digestive enzyme activity and gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 197, 43–51. doi:10.1016/j.cbpa.2016.03.010
- Mata-Sotres, J.A., Tinajero-Chavez, A., Barreto-Curiel, F., Pares-Sierra, G., Del Rio-Zaragoza, O.B., Viana, M.T., Rombenso, A.N., 2018. DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in *Totoaba macdonaldi* fish oil-free feeds containing

poultry by-product meal and beef tallow. *Aquaculture* 497, 440–451.
doi:10.1016/j.aquaculture.2018.08.015

McGoogan, B.B., Gatlin, D.M., III, 1997. Effects of replacing fish meal with soybean meal in diets for red drum *Sciaenops ocellatus* and potential for palatability enhancement. *J. World Aquaculture*

Moyano, F.J., Saenz de Rodrigañez, M.A., Diaz, M., Tacon, A.G.J., 2014. Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Rev. Aquac.* 6, 1–20.

NCR. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. doi:
<https://www.nap.edu/resource/13039/Fish-Shrimp-Report-Brief-Final.pdf>

Rawles, S.D., Riche, M., Gaylord, T.G., Webb, J., Freeman, D.W., Davis, M., 2006. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass (*Morone chrysops*♀ x *M. saxatilis*♂). *Aquaculture* 259, 377–389

Román -gavilanes, A.I., Martínez-montaña, E., Viana, M.T., 2015. Comparative Characterization of Enzymatic Digestion from Fish and Soybean Meal from Simulated Digestive Process of Pacific Bluefin Tuna , *Thunnus orientalis* 46, 409–420. doi:10.1111/jwas.12204

Roman-Gavilanes, A., Martinez-Montano, E., Viana, M.T., 2015. Comparative characterization of enzymatic digestion from fish and soybean meal from simulated digestive process of Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *J. World Aquacult. Soc.* 46 (4), 409–420.

Rombenso, A.N., Trushenski, J.T., Schwarz, M.H., 2017. Beef tallow is suitable as a primary lipid source in juvenile Florida pompano feeds. *Aquac. Nutr.* 23, 1274–1286. doi:10.1111/anu.12502

Sathivel, S., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I. I., King, J. M., & Basnayake, B. F. A. (2003). Thermal degradation of fatty acids and catfish and menhaden oils at different purification steps. *Journal of the American Oil Chemists' Society*

Tacon, A.G.J., Metian, M., 2015. Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 23, 1-10.

Turchini G.M., Francis, D.S., De Silva, S.S. 2007. A whole body, in vivo, fatty acid balance method to quantify PUFA metabolism (desaturation, elongation and beta-oxidation). *Lipids*, 42: 1065-1071.