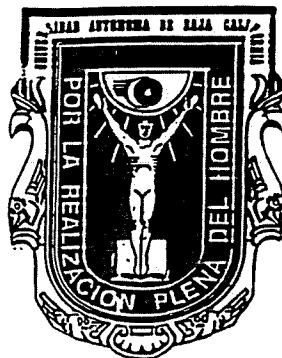


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



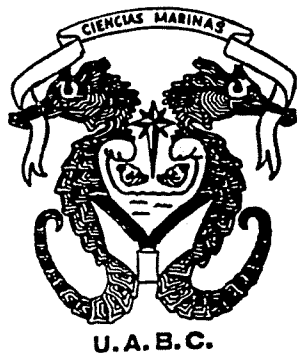
EFECTO DE LA HIDRÓLISIS DE LOS ENSILAJES ÁCIDOS

DE MACARELA (*Scomber japonicus*)

EN EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y CRECIMIENTO

EN JUVENILES DEL ABULON (*Haliotis fulgens*)

TESIS



Que como requisito para
obtener el título de

OCEANÓLOGO

presenta:

JUDITH HAYDEE GONZALEZ BENITEZ

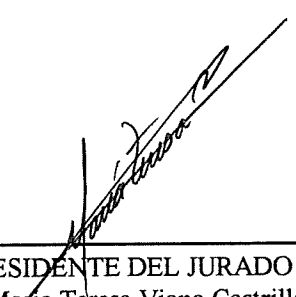
Ensenada, B.C., Diciembre de 1995

EFFECTO DE LA HIDROLISIS DE LOS ENSILAJES ACIDOS DE
MACARELA (*Scomber japonicus*) EN EL PERFIL DE AMINOACIDOS Y
CRECIMIENTO EN JUVENILES DE ABULON (*Haliotis fulgens*).

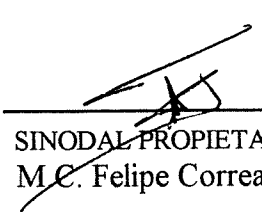
TESIS
QUE PRESENTA

JUDITH HAYDEE GONZALEZ BENITEZ

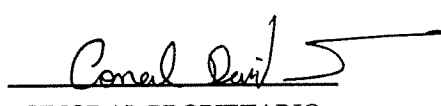
APROBADA POR:



PRESIDENTE DEL JURADO
Dra. Maria Teresa Viana Castrillón



SINODAL PROPIETARIO
M.C. Felipe Correa Díaz



SINODAL PROPIETARIO
M.C. Conal David True

RESUMEN

El alimento balanceado elaborado con ensilaje ácido de macarela, cruda (CR) y cocida (CO); ésta última con inactivación de las enzimas digestivas y por ende, menor porcentaje de hidrólisis; probaron tener diferencias en el perfil de aminoácidos libres. En el alimento CR se observó que hubo mayor desaparición de los aminoácidos inestables. Así tenemos que aquellos estables, como la glicina (gly) aumentaron proporcionalmente su aparición mostrando un 19.54 % para CR, y 3.39% para CO. De manera contraria, la lisina, que es un aminoácido inestable, fue menor para CR con un 1.48 % y 8.46 % para CO. Esto demuestra que la lisina se vio seriamente afectada con la conservación del ensilaje crudo, debido probablemente a la degradación enzimática de las enzimas endógenas presentes en las vísceras del pescado. Los otros aminoácidos, tanto estables como inestables, mostraron diferencias menores entre los porcentajes de CR - CO siendo éstas menores a 5 unidades. Las diferencias en el contenido de aminoácidos entre tratamientos no afectaron significativamente el crecimiento de los juveniles de abulón (*Haliotis fulgens*).

Este trabajo es uno de los primeros a nivel Nacional que involucra el uso de la técnica de Amino Quant para la determinación de perfiles de aminoácidos. Se hace un análisis de la utilización de esta técnica incluyendo el cuidado y utilización de los diversos reactivos.

Se concluye que el calentamiento de la materia prima no fue suficiente para detener la hidrólisis de aminoácidos limitantes, que influyen positivamente en el crecimiento de los abulones.

DEDICATORIA

A mis Padres;

Porque éste fue un sacrificio compartido,

donde la aportación más importante fue

la de ustedes.

Gracias;

por el amor, el apoyo y la confianza,

... por la dedicación, paciencia, y comprensión.

Gracias;

por seguir siendo mis guías en el camino

de la vida.

Así hablaba Quetzacoatl:

*Enseñen a sus hijos a volar,
mas no les impongan las formas de hacerlo,
porque quizás ustedes volaron en la vida como gaviotas,
y ellos deseen hacerlo como pajarillos.
Quizás ustedes volaron en la vida como halcones,
y ellos deseen hacerlo como águilas.*

*Antes bien, enseñenles a escoger su vuelo,
mas para ello deben antes conocer
los secretos del vuelo,
los secretos que están en todas las formas
de volar.*

Coiatl Acotl.

AGRADECIMIENTOS

**A mis hermanos Hugo y Javier, por su inagotable
paciencia y comprensión.
Mil Gracias!!.**

A los profesores de la **Facultad de Ciencias Marinas**, por la formación académica recibida a lo largo de mi carrera.

Al **Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO-UABC)**, por permitirme hacer uso de sus instalaciones durante la realización de éste trabajo que forma parte de un proyecto financiado por **International Foundation of Science**.

A mi directora de tesis, **Dra. Ma. Teresa Viana**, no sólo por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo, sino por dejarme ver en ella a una buena amiga.

A mis Sinodales **M.C. Conal David True** y **M.C. Felipe Correa**, por permitir que este trabajo fuera mejor.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de química; **Hugo, Pepe, Luis Enrique, Ruth, Elda, Sol, Marco, David, Billy** y **Roberto**.

A mis compañeros del laboratorio de Instrumentación; **Victor M., Tex, Edmundo, Perla, "Mamey", Sergio Agüñiga** y **Pedro**.

Por su tiempo y espacio a: **Cirina, Chano, Evelia, Pepe-archivaldo, Walter, Victor, Reina, Oscar, Maricarmen, El Chato, Rodolfo** y **Gloria**, por permitirme descubrir en ellos, el tesoro de la amistad!

Muy especialmente a:

Pablo Ferrer; por su incondicional ayuda y amistad.

y a:

Julio Villaescusa y **Dr. Vinicio Macías**. Porque siempre pude contar con ellos.

A los Totoploids, en especial: **"Vigotes", Demetrio, Andrés, Chuy, Dany, Charly, Felipe, "la Morra", Jaime, Angélica C., Benito, "el Oso", Honorio, Eriko** y **Zuray**.

A las Familias: Pérez-Chaparro, Medina-Preciado, Fams. Usman y Benítez, en especial a la Sra. Imelda Pacheco, Sra. Lupita, Sra. Rosalina y Tennesi.

A unos "físicos", que por azares del destino, coincidieron en mi vida, y pusieron un poco de chispa en ella; "El chilaquil", Pablo, Mr. Coello y el "Doitor Rangel". Por todos los momentos compartidos. Viva la Giganta!!.

Al Grupo de Ciclismo del CICESE, en especial a Miguel Farfán.

A Carlos Carnalla del CICESE, por el sellado de los tubos.

A Doña Tere, por compartir conmigo todos y cada uno de los días de mi carrera.

A Jorge Olivos, por poner el primer granito de arena a la duna.

A todas las personas que no nombro, pero que de una u otra manera han contribuido; no sólo en mi formación académica; Dra. Meredick, y Dr. Estéfano, por su ayuda incondicional, Pfra. Estela Parrilla; por permitirme realizar el Servicio Social en el Museo de Ciencias Al Tex; por las horas compartidas en el cromatógrafo, M.C. Zaúl García, por facilitarme parte de los reactivos, M.C. Román Lizárraga; sólo por sonreír.

Al "Caballero Aguila" por. . . , por Ser. Por enseñarme que los sentimientos siempre se verán restringidos por las palabras.

CONTENIDO

I INTRODUCCIÓN.	1
II ANTECEDENTES.	5
III OBJETIVOS.	9
IV MATERIALES Y MÉTODOS.	10
IV.1 Análisis químicos.....	10
IV.2 Prueba de crecimiento	16
V RESULTADOS.	21
VI DISCUSIÓN.	34
VII CONCLUSIONES.	41
VIII LITERATURA CITADA.	42

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1. Perfil de aminoácidos del alimento CR preparado a partir de ensilaje ácido de macarela. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.....22
- Figura 2. Perfil de aminoácidos del alimento CO preparado a partir de ensilaje ácido de macarela. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.....23
- Figura 3. Estándar de aminoácidos. Primer nivel de la curva de calibración a una concentración de 900 pmol. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.....25
- Figura 4. Estándar de aminoácidos. Segundo nivel de la curva de calibración a una concentración de 225 pmol. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.....26
- Figura 5. Estándar de aminoácidos. Tercer nivel de la curva de calibración a una concentración de 90 pmol. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.....27
- Figura 6. Corrida con ausencia de derivatización de aminoácidos primarios, por degradación del OPA. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090.....29
- Figura 7. Corrida con tetrahidrofuran (THF) degradado resultando en una pobre resolución. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.....30
- Figura 8. Corrida con trietilamina (TEA) degradada resultando en una pobre resolución. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.31

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Ingredientes incluidos en el alimento balanceado de los tratamientos de ensilaje crudo (CR) y ensilaje cocido (CO).....	18
Tabla II. Contenido de aminoácidos (%) de los alimentos balanceados CR y CO a partir de los perfiles obtenidos mediante HPLC con pre-derivatización con OPA.....	24
Tabla III .. Crecimiento total en longitud y peso de juveniles de abulón alimentados durante 140 días con la dieta balanceada CR y CO. El error estándar está indicado dentro del paréntesis.....	33
Tabla IV .. Tasas de crecimiento de juveniles de abulón alimentados durante 140 días con el alimento balanceado CR y CO. El error estándar se indica dentro del paréntesis. Cifras con letras diferentes indica diferencias significativas a través del tiempo.....	33

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son el material principal que constituye a los organismos vivos. Son consideradas como una de las sustancias más complejas e importantes que deben ser consumidas diariamente en una dieta (Belitz y Grosch, 1987). La palabra proteína proviene del griego *proteios* que significa “importancia primaria” y son el compuesto esencial para cualquier organismo (Hammock, 1995). Los tejidos cerebral, conectivo y muscular, están formados por proteína, además de los anticuerpos del sistema inmunológico, así como también las enzimas metabólicas y hormonas que regulan las actividades bioquímicas del organismo (Belitz y Grosch, 1987).

Las proteínas, al igual que grasas y carbohidratos, contienen un esqueleto de carbonos con oxígeno e hidrógeno unidos a ellas. Sin embargo, éstas se caracterizan por contener nitrógeno, formando compuestos únicos (Creighton, 1993). Algunas proteínas contienen además azufre, fósforo y hierro como parte de su estructura. Cada molécula de proteína está compuesta de subunidades llamadas aminoácidos. Los organismos vivos no son capaces de sintetizar todos los aminoácidos y algunos de ellos son sintetizados a velocidades muy lentas, (Shimada, 1983). Son precisamente éstos, los que deben ser aportados a través de la dieta, y por lo tanto son denominados aminoácidos esenciales. A diferencia de los aminoácidos esenciales, podemos distinguir a los limitantes, que son aquellos que un organismo en particular requiere en una alta proporción, por lo que deban ser suministrados de acuerdo a sus necesidades (Tacon, 1989). A través de la dieta, las

proteínas suplen la cantidad de aminoácidos necesarios para llevar a cabo un sinnúmero de actividades, como el crecimiento de tejido y mantenimiento del organismo (Brown, 1990).

Cada proteína se caracteriza por el tipo y secuencia de aminoácidos que la contienen, por lo que la cantidad de proteína suministrada en la dieta debe estar calculada de acuerdo al porcentaje de los aminoácidos esenciales, y no sólo de la proteína total (Shimada, 1983). Actualmente se sabe que las diferentes necesidades en cuanto a la cantidad de cada uno de los aminoácidos esenciales depende del organismo, por lo que es importante cumplir con estos requerimientos para obtener el mayor provecho de la proteína a consumir (Shimada, 1983). En general, los peces requieren de mayores cantidades que los animales terrestres, debido a que éstos últimos presentan menores requerimientos (Lovell, 1982).

Por lo general, el contenido proteico en las dietas balanceadas es reportado de una manera burda como nitrógeno total mediante la determinación de Kjeldhal, sin conocer si los aminoácidos esenciales están siendo administrados de una manera adecuada. No obstante, existe actualmente la idea de balancear las dietas con base en su proteína ideal, es decir, de acuerdo a los aminoácidos requeridos por el organismo, y de esta manera lograr optimizar el alimento (Shimada, 1983).

Existen listados del contenido de aminoácidos de los ingredientes comerciales que se encuentran en el mercado. Sin embargo, el control de calidad de éstos no siempre es adecuado ya que no garantiza el contenido y proporción exacta de los mismos. Por otro lado en fuentes de proteína no convencional, frecuentemente utilizadas para alimento de organismos marinos, es muy difícil la evaluación de aminoácidos. Para balancear un alimento a proteína ideal, la proteína de los ingredientes o alimento completo debe de incluir los aminoácidos esenciales en la dieta, asegurando así un óptimo desarrollo del organismo.

En el Instituto de Investigaciones Oceanológicas se lleva a cabo un proyecto que pretende el conocer las necesidades nutricionales del abulón, mediante el desarrollo de dietas balanceadas a partir de subproductos pesqueros. En Ensenada se cuenta con una gran variedad de subproductos, incluyendo el desperdicio de peces y moluscos, los cuales han mostrado ser una buena fuente de proteína en dietas para abulón (López, 1994). Al igual que en otras ramas de la nutrición, para lograr un avance en el conocimiento nutricional del abulón, se necesita conocer el perfil de aminoácidos contenido y su relación con el crecimiento (Uki et al., 1985; Simpson, 1995). Los subproductos pesqueros, como la víscera de atún, son generalmente utilizados para la elaboración de harinas de pescado, mismas que se venden con una calidad inferior por su aparente menor contenido de proteína y elevada concentración de minerales. En dietas para abulón los subproductos pesqueros han dado buenos resultados mediante una conservación ácida (Viana et al., en prensa). Una de las formas más adecuadas para mantener las características nutricionales

de los subproductos de la pesca, es mediante el proceso del ensilaje. Este proceso es utilizado desde 1920 y fue adaptado por Edin en 1930 para preservar pescado (Backhoff, 1976). Según Raa y Gildberg (1982), los ensilajes ácidos, a diferencia de los elaborados por fermentación se caracterizan por su estado líquido y libre de microorganismos, ya que los ácidos presentes funcionan como agentes antimicrobianos (Raa y Gildberg, 1982). El hecho de utilizar fuentes de proteína preservada con ácidos implicaría la disminución de aquellos aminoácidos poco estables en un medio ambiente ácido, como lo es el triptofano (Raa y Gildberg, 1982).

Los ensilajes ácidos de pescado se producen y utilizan en varios países como complemento alimenticio en aves de corral, cerdos y vacas, así como en el cultivo de peces marinos (Raa, 1980; Austreng, 1982; Raa y Gilberg, 1982; Viana, 1982; Raa et al., 1983; Stone et al., 1989). También se ha utilizado recientemente en la formulación de dietas artificiales para juveniles de tilapia *Oreochromis niloticus* (Fagbenro y Jauncey, 1995).

En el presente trabajo, se pretende obtener los perfiles de aminoácidos de alimentos elaborados a partir de ensilaje de macarela cruda (CR) y cocida (CO) como principal fuente de proteína en dietas balanceadas para juveniles de abulón, y de esta manera relacionar dichos perfiles con el crecimiento de los organismos.

ANTECEDENTES

Técnica de Análisis.

En México aún no es una práctica común el determinar el contenido de aminoácidos en una dieta y por lo tanto balancearlas en cuanto a proteína ideal, esto por el inconveniente de un análisis costoso y difícil de realizar. La manera de cuantificar el contenido de aminoácidos ha ido evolucionando rápidamente, utilizando desde técnicas de separación en papel con tinción de ninhidrina, hasta complejos métodos de cromatografía de alta resolución con sistemas de intercambio iónico y/o interacciones hidrofóbicas (Chicz y Regnier, 1990). La manera convencional para la determinación de aminoácidos se basa en la automatización del sistema mediante un analizador automático de aminoácidos (Hugli, 1989). El método se basa en la separación de los aminoácidos con una columna de intercambio iónico, para una posterior tinción con ninhidrina. Este proceso si bien es simple, requiere de equipo costoso lo cual incrementa considerablemente el precio del análisis.

El método desarrollado mediante el uso de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) permite la versatilidad, resultando en una buena opción cuando se requieren diversas determinaciones y no se cuenta con un gran número de muestras para analizar. El HPLC, por lo tanto, reduce el costo de análisis a diferencia de un analizador automático, que es específico para aminoácidos. Sin embargo, el uso del HPLC implica que la rutina de análisis sea más lenta, desde el cambio de columna apropiada hasta la obtención de los parámetros iniciales, mismos que deben ser ajustados en cada día de trabajo.

La cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se basa en los mismos principios de separación que la cromatografía convencional, solo que se realiza a una alta presión. El poder de resolución de una columna cromatográfica HPLC, está dado por la longitud de ésta y el número de platos teóricos por unidad de longitud (Chicz y Regnier, 1990). El término de platos teóricos está referido a la interacción entre el soluto y la columna; es decir; la afinidad entre ambos. A menor afinidad; menor número de platos teóricos, y entre más afín es el soluto con la resina de la columna, mayor es el tiempo de retención y por ende, el número de platos teóricos.

Al realizar la cuantificación en el análisis de aminoácidos se requiere de ciertos procedimientos indispensables para que éste sea confiable: Preparación de la fase móvil, preparación de reactivos, preparación de los estándares de calibración y preparación de las muestras.

Los métodos más utilizados para determinación de aminoácidos son mediante el empleo de columnas de intercambio iónico e interacciones hidrofóbicas. La primera se basa en la separación a través de cargas y la segunda es con base en la interacción entre las fuerzas hidrofóbicas de los compuestos. El sistema de separación mediante interacciones hidrofóbicas ofrece una mayor resolución, donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil es un solvente no polar. Lo cual resulta en la separación de los compuestos químicos de la muestra problema de acuerdo a su hidrofobicidad (Chicz y Regnier, 1990).

Existen varios métodos para la determinación de los perfiles de Aminoácidos; uno de éstos es el de Amino Quant de Hewlett-Packard, el cual ofrece reducidos tiempos de análisis y tiene un límite de detección de hasta 1 pmol (Sarwar y Botting, 1993).

Subproductos pesqueros

El uso de subproductos pesqueros constituye una alternativa de bajo costo cuando son almacenados como ensilajes (Hardy et al., 1983). En México dichos subproductos casi no son aprovechados, constituyendo un foco de contaminación, al ser desechados cerca de las áreas costeras. El ensilaje permite conservar este subproducto mediante la adición de ácidos, logrando así conservar el valor nutritivo para su posterior utilización. Aunque ésta es una buena alternativa, puede presentar como desventaja un desbalance en el contenido de aminoácidos, ya que por lo general, los subproductos presentan un alto contenido de colágena (vísceras y piel) aunado al grado de hidrólisis proteica (Kompang, et al., 1980).

Existen varios estudios en donde se ha intentado detener el grado de hidrólisis de un ensilaje mediante la inactivación térmica (Viana et al., 1993), partiendo del hecho de que la hidrólisis ocurre principalmente a consecuencia de la actividad de las enzimas digestivas presentes en el subproducto (Raa y Gildberg, 1982; Raa et al., 1983). Sin embargo, no es claro que al preservar el subproducto pesquero inactivando las enzimas digestivas mediante el calentamiento, puedan “protegerse” los aminoácidos.

El ensilaje de subproductos pesqueros ha probado ser un buen ingrediente en la elaboración de dietas para juveniles de abulón, junto con harina de pescado y soya (Viana et al., en prensa). Sin embargo el ensilaje no ha sido probado como única fuente de proteína, desconociéndose su valor nutritivo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar como afecta el grado de hidrólisis de los ensilajes ácidos (crudo (CR) y cocido (CO) de macarela en el perfil de aminoácidos y crecimiento en juveniles de abulón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si el grado de hidrólisis afecta el contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales.
- Evaluar si el grado de hidrólisis afecta el crecimiento de juveniles de abulón cuando se les suministra ensilaje ácido de macarela como fuente principal de proteína.
- Evaluar las ventajas y desventajas que presenta la técnica de análisis para la obtención de perfiles de aminoácidos descrita por Amino Quant (Hewlett-Packard).

METODOLOGÍA

Análisis químicos

Hidrólisis de las muestras

Las muestras de alimento elaborado con ensilaje de macarela cruda (CR) y cocida (CO) como fuente principal de proteína, fueron secadas a 60 °C. Muestras de 0.3 g de alimento se colocaron en tubos de vidrio de borosilicato (pyrex), y se les agregó 3 ml de una solución 6N de HCl. Los tubos fueron sellados en presencia de nitrógeno para tener una atmósfera libre de oxígeno. Una vez sellados se sometieron a un calentamiento de 110°C durante 24 h (Chicz y Regnier, 1990).

Preparación de las muestras

Después de hidrolizadas las muestras, fueron filtradas con una malla de poro de 0.45 µm, almacenadas en microviales (Hewlett Packard), y guardadas en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Descripción del sistema Amino Quant

Para el análisis se empleó un HPLC modelo Win HP-1090, utilizando el método de Amino Quant (Hewlett-Packard, 1990). Con el objeto de evaluar la posibilidad de disminuir los costos de análisis, se utilizaron también algunos reactivos de SIGMA.

Para ésto, se utilizó en la fase estacionaria una columna Amino Quant de fase inversa (C - 18) de 200 x 2.1 mm, la cual trabaja por medio de interacciones hidrofóbicas. Una precolumna de derivatización con o-ftalaldehido (OPA) para aminoácidos primarios, y 9-fluorenylmethyl chloroformato (FMOC) para aminoácidos secundarios, empleando un amortiguador de boratos a una concentración de 0.4 M a pH de 10.2, según método descrito en el Manual HPLC-HP-1090).

a) Fase móvil

Para la fase móvil del canal A se utilizó una mezcla de acetato de sodio anhidro (0.82 g) diluido en 500 ml de agua grado HPLC. Después de disueltos los cristales, se añadió 90 µl de trietilamina (TEA), y se ajustó el pH a 7.2 con ácido acético al 2%. Por último se añadió 1.5 ml. de tetrahidrofuran (THF) grado UV. Según Manual Hewlett Packard, 1990).

Para el canal B, la mezcla fue de acetato de sodio anhidro (0.82 g) disuelto en 100 ml de agua grado HPLC. Dicha mezcla fue ajustada a un pH de 7.2 con ácido acético al 2% y finalmente se agregaron los solventes orgánicos; metanol y acetonitrilo (200 ml de cada uno) (Hewlett Packard, 1990).

Ambos solventes (A y B) fueron filtrados a vacío con filtros de teflón de 0.45 µm.

Los solventes fueron preparados diariamente, para evitar variaciones en las concentraciones de los reactivos ocasionadas por los compuestos volátiles.

b) Derivatizadores

Se utilizaron dos derivatizadores, OPA para la cuantificación de aminoácidos primarios, y FMOC para la cuantificación de aminoácidos secundarios. Estos derivatizadores fueron adquiridos a través de la Hewlett Packard. La preparación del reactivo de OPA de SIGMA se realizó agregando 10.0 mg de o-ftalaldehído más 10.0 mg de ácido 3,3 mercaptopropiónico por cada ml de amortiguador de boratos al 0.4M a un pH de 10.2.

c) Estándares y curva de calibración

Los estándares fueron adquiridos de Hewlett Packard del Kit de Amino Quant, en una presentación de 10 ampollitas de 1 ml cada una con una concentración de 1 nmol, disueltas en HCl al 0.1 N. Para elaborar la curva de calibración se eligieron tres concentraciones diferentes de los estándares, éstas de acuerdo a la concentración de las muestras, mismas que fueron también diluidas para cubrir un rango entre 90 y 900 pmol. Los estándares de SIGMA fueron disueltos en 0.1N HCl y se trabajaron de igual manera que los anteriores.

d) Estándar interno

Con el propósito de ajustar la concentración de las diluciones se recomienda la utilización de estándares internos, los cuales se adicionan en la misma concentración a las distintas diluciones de la muestra. En éste caso se utilizó la norvalina, empleada a una concentración de 250 picomolar. El presente trabajo se basó únicamente en la cuantificación de los aminoácidos primarios por lo que sólo se empleó norvalina como estándar interno.

e) Parámetros iniciales de la cromatografía:

Se refieren a las condiciones iniciales del sistema, mismas que se mantuvieron al inicio de cada análisis y pueden resumirse de la siguiente manera:

Flujo: 0.45 0.000 ml/min.
Solvente A: 100.0 0.0 % fase móvil A
Solvente B: 0.0 0.0 % fase móvil B
Temperatura: 40.0 39.9 ° C.
Max. presión: 400 2 bar. Min.Pres: 50 bar.
Tiempo total: 25.00 0.0 min.

f) Gradiente de los solventes.

El cronograma de la corrida, indica la manera en que los solventes se intercambian en el tiempo, formando un gradiente continuo de separación. Con objeto de limpiar la columna de cualquier remanente de reactivos que pudiese quedar en ella, al final de la corrida, el gradiente se mantuvo durante un tiempo para su posterior restablecimiento y

calibración para la siguiente corrida. A continuación se muestra el gradiente utilizado en los análisis:

min 17.00	Solvente	A: 40.0 %	B: 60.0 %	C: 0.0 %
min 18.00	Solvente	A: 0.0%	B: 100.0 %	C: 0.0 %
min 18.10	Flujo	0.450 ml/min.		
min 18.50	Flujo	0.800 ml/min.		
min 23.90	Flujo	0.800 ml/min.		
min 24.00	Flujo	0.450 ml/min.		
min 24.00	Solvente	A: 0.0 %	B: 100.0%	C: 0.0 %.

g) Derivatización.

El inyector incluye, dentro del programa, la derivatización automatizada, consistiendo en la extracción de la muestra y del reactivo de OPA para su mezclado, previo a la inyección del segundo derivatizador (FMOC). La muestra derivatizada y mezclada es entonces inyectada a la columna (Hewlett Packard, 1990).

El programa entonces puede resumirse de la siguiente manera:

1. Tomar 5.0 μ l de amortiguador de boratos pH 10.2
2. Tomar 1.0 μ l del reactivo de OPA
3. Se enjuaga la aguja del inyector en agua
4. Tomar 1.0 μ l de muestra.
5. Se enjuaga la aguja del inyector en agua
6. Se hace la mezcla de los 7.0 μ l
7. Tomar 1.0 μ l de reactivo de FMOC
8. Se enjuaga la aguja del inyector en agua
9. Se hace la mezcla de los 8.0 μ l
10. Se inyecta la muestra.

h) Detector.

En el programa del detector es donde se establece la longitud de onda y las características de las señales que van a ser medidas. El detector del HPLC puede medir la absorbencia de ocho diferentes longitudes de onda simultáneamente, pero en este caso únicamente utilizamos dos que son las adecuadas para el método de Amino Quant, 338 nm.(señal A) con un ancho de banda de 10, y 262 nm (señal B) con un ancho de banda de 10. Para aminoácidos primarios y secundarios respectivamente.

Prueba de crecimiento

Elaboración del alimento

El alimento fue elaborado a partir de ensilaje ácido crudo (CR) y cocido (CO) de macarela (*Scomber japonicus*) como principal fuente de proteína, proporcionada por Tecmar, Ensenada, BC. Filete junto con piel y vísceras, fueron molidos en fresco en un molino marca Hobart de carne previo a la adición de los ácidos, consistiendo ésta en 2.6 % de ácido cítrico y 2.6% de ácidos fosfórico, ajustando el pH con H_2SO_4 para alcanzar un pH de 3.0, y 1 % de benzoato de sodio como conservador. Esta metodología utilizada para los ensilajes es la descrita por Viana et al. (1993). Diariamente se llevó un control de oscilaciones en el pH sin registrarse ninguna variación considerable. Con el propósito de detener la hidrólisis provocada por enzimas digestivas, la materia prima se distribuyó en dos lotes, uno de 9 kg y otro de 9.5 kg, éste último fue cocido a 60°C durante 15 minutos y enfriado a temperatura ambiente. Ambos fueron almacenados a temperatura ambiente durante 60 días.

El alimento balanceado se elaboró mezclando los ingredientes señalados en la Tabla I, los cuales están basados en las recomendaciones de Uki et al. (1985) y Uki y Watanabe (1992). El ensilaje utilizado se neutralizó mediante la adición de carbonato de calcio y sodio (2.5 % de cada uno) para obtener un pH de 5.0. La mezcla de vitaminas y minerales fue la recomendada por Hahn (1989). Todos los ingredientes fueron homogenizados hasta obtener la mezcla, utilizando un extrusor de pasta Rosito Bisanti

para formar comprimidos de 20x20x2 mm. El alimento fue congelado a -20°C hasta su utilización.

Tabla I. Ingredientes incluidos en el alimento balanceado de los tratamientos de ensilajes neutralizados crudo (CR) y cocido (CO).

Ingredientes	Ensilaje crudo (CR)	Ensilaje cocido (CO)
Ensilaje*	37.0	37.0
Harina de pescado	-	-
Harina de maíz	12.0	12.0
Almidón	12.0	12.0
Harina de algas	8.9	8.9
Alginato de sodio	8.0	8.0
Gelatina	8.9	8.9
Mezcla de vitaminas	1.8	1.8
Mezcla de minerales	5.3	5.3
Celulosa	5.3	5.3
Metionina	0.18	0.18
Cloruro de colina	0.27	0.27
BTH	0.4	.0.4
Vitamina "C"	0.18	0.18
Benzoato de sodio	0.18	0.18
TOTAL	100.05	100.05

* Ensilaje neutralizado

Condiciones experimentales

Los datos de crecimiento generados en el proyecto de “Efecto del ensilaje crudo y cocido sobre el crecimiento de juveniles de abulón *Haliotis fulgens*”, financiado por la IFS (Fundación Internacional para la Ciencia), se utilizaron para correlacionarlos con los perfiles de aminoácidos aquí obtenidos.

Para el experimento se utilizaron abulones (*Haliotis fulgens*) de seis meses de edad obtenidos del laboratorio de Bahía Tortugas; B.C. Sur, México. Los organismos se acondicionaron al laboratorio durante un periodo de 21 días. Para probar el efecto de las dietas balanceadas de ensilajes crudo (CR) y cocido (CO) en el crecimiento, se utilizaron seis cubetas plásticas de 20 litros de capacidad, con 36 organismos para cada tratamiento (3 tratamientos). Las dietas se suministraron durante la noche, y después de 12 horas, el alimento remanente fue retirado. La longitud y peso corporal fueron medidos cada 4 semanas con un vernier electrónico digital (± 0.03 mm) y una balanza electrónica (± 0.001 de error), respectivamente.

Análisis estadístico

Las muestras obtenidas de los perfiles de aminoácidos no fueron sometidas a análisis estadístico debido a que no se contaba con suficientes réplicas.

Para comparar las tasas de crecimiento en longitud y crecimiento específico a través del tiempo, se aplicó un análisis de varianza de una vía (Zar, 1984) para cada

tratamiento, seguido por un análisis de comparación múltiple de Student Newman Keuls (SNK) para separar los grupos diferentes indicados con diferentes subíndices.

Para observar posibles diferencias entre los dos tratamientos para cada tiempo, tanto en el crecimiento total de longitud y peso, como en las tasas de crecimiento ($\mu\text{m}/\text{día}$ y $\%/ \text{día}$), fueron utilizadas pruebas de t-student (Steel y Torrie, 1988).

El paquete estadístico utilizado en este análisis fue el Sigma - Stat, para windows.

RESULTADOS

Análisis de aminoácidos

Después de trabajar durante 10 meses en la técnica de Amino Quant, no se obtuvieron resultados suficientes como para realizar un análisis estadístico confiable. Aunque cabe mencionar que los obtenidos son fidedignos y representativos de la composición general de las muestras. En la figura 1 y 2, y Tabla II, se muestran los perfiles de aminoácidos en porcentajes del alimento balanceado **CR** y **CO**, respectivamente. Aquí puede observarse que el **CR** contiene un menor porcentaje de ácido aspártico y glutámico, serina, tirosina, metionina, y sobre todo lisina.

La Figura 3, 4 y 5 muestran los niveles de calibración de la curva estándar con los cuales se obtuvieron los perfiles de aminoácidos de las muestras de alimento **CR** y **CO**. Dichos estándares de aminoácidos fueron elaborados a tres diferentes diluciones, encontrando la mejor resolución en el siguiente rango de concentraciones:

Amino Ácido Estándar,	900 pmol/μl.	en 0.1N de HCl.
Amino Ácido Estándar,	225 pmol/μl.	en 0.1N de HCl.
Amino Ácido Estándar,	90 pmol/μl.	en 0.1N de HCl.

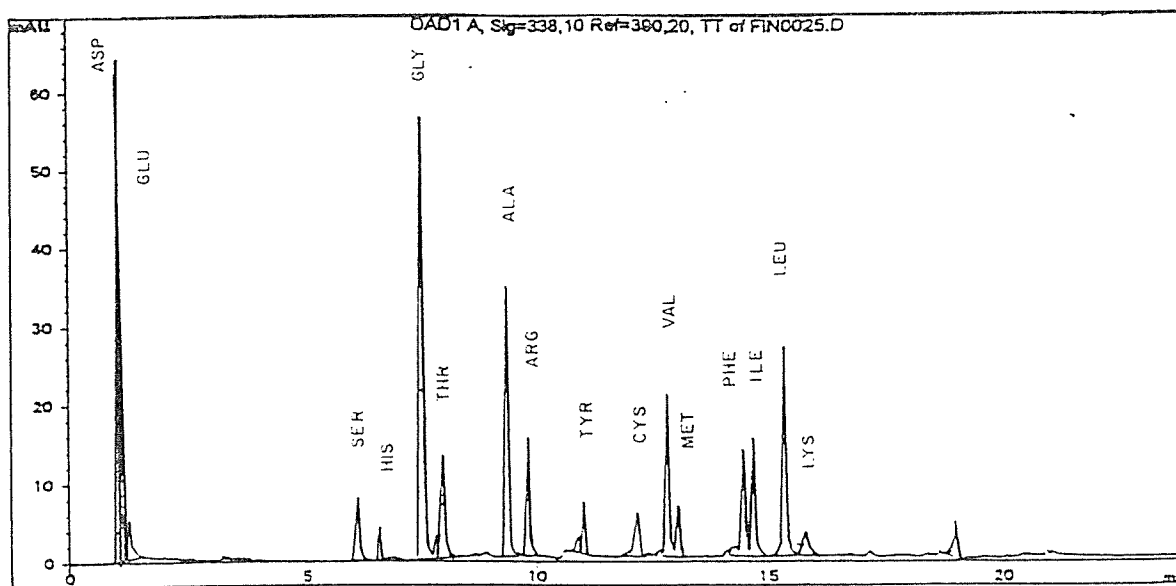


Figura 1. Perfil de aminoácidos del alimento CR, preparado a partir de ensilaje ácido de macarela. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.

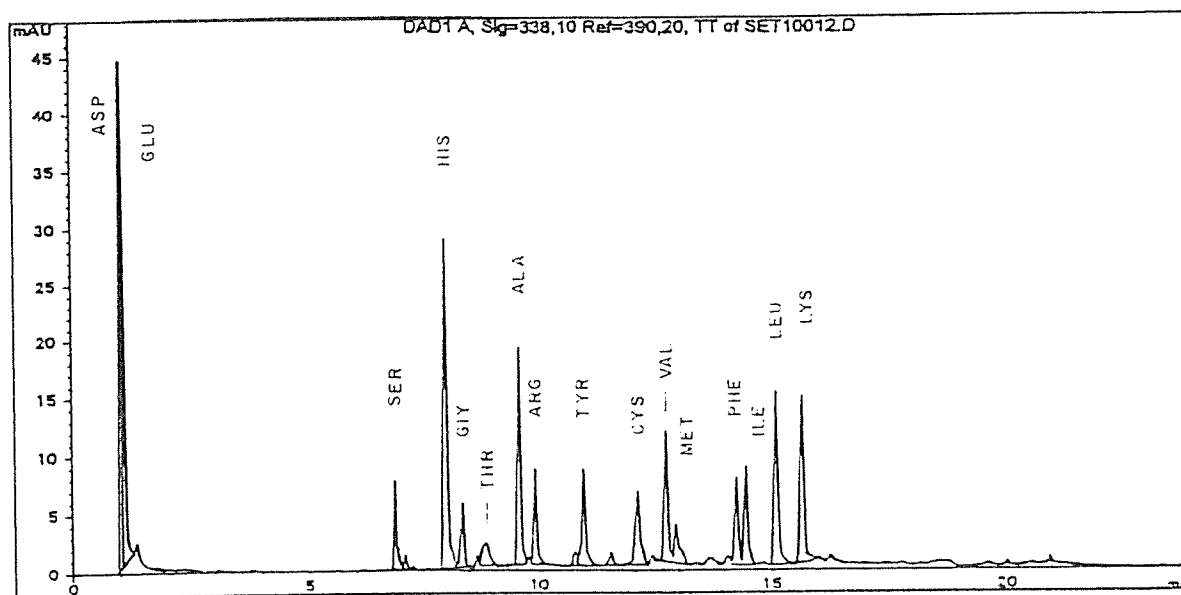


Figura 2. Perfil de aminoácidos del alimento CO, preparado a partir de ensilaje ácido de macarela. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.

Tabla II. Porcentaje del contenido de aminoácidos (%) presentes en los alimentos balanceados CR y CO obtenidos mediante HPLC utilizando OPA para la prederivatización.

Aminoácidos	Alimento CR	Alimento CO	Diferencias CR - CO
Ac. Aspártico.	13.04	17.88	-4.84
Ac. Glutámico	4.73	9.56	-4.83
Serina	3.15	3.92	-0.77
Histidina*	1.16	0.46	0.70
Glicina	19.54	3.39	16.15
Treonina*	4.50	2.18	2.32
Alanina	11.78	9.87	1.91
Arginina	5.26	4.71	0.55
Tirosina	2.11	5.31	-3.20
Cisteína	3.20	5.13	1.93
Valina*	7.00	6.42	0.60
Metionina*	2.57	2.95	-0.38
Fenilalanina*	4.73	4.65	0.08
Isoleucina*	5.43	5.10	0.33
Leucina*	10.31	9.62	0.69
Lisina*	1.48	8.86	-7.38

* Aminoácidos esenciales

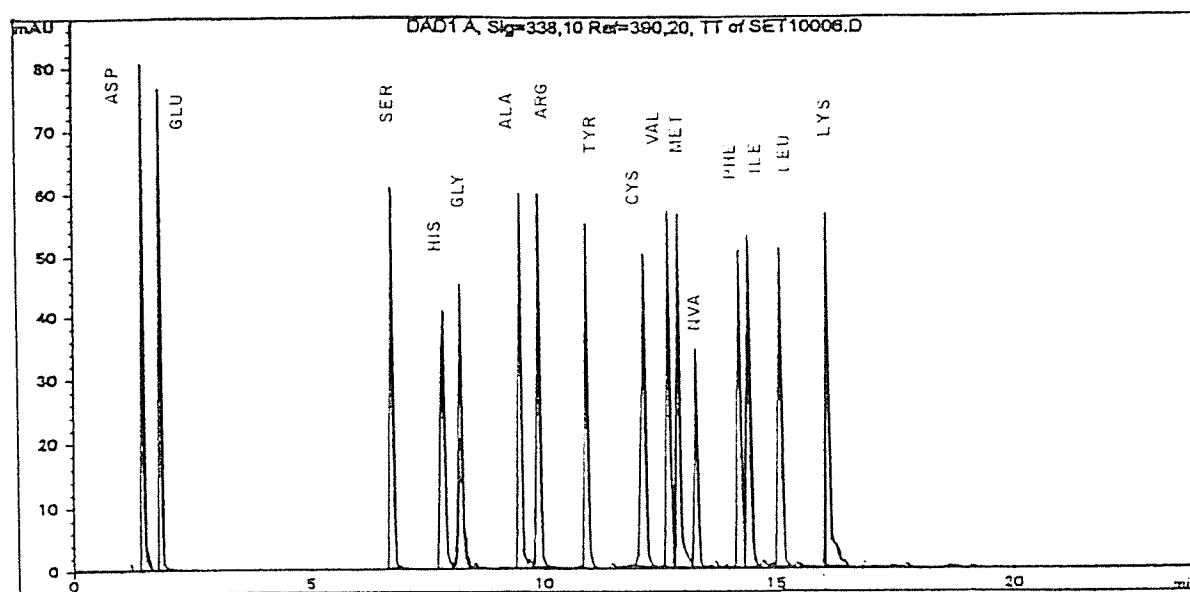


Figura 3. Estándar de aminoácidos. Primer nivel de la curva de calibración a una concentración de 900 pmol. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.

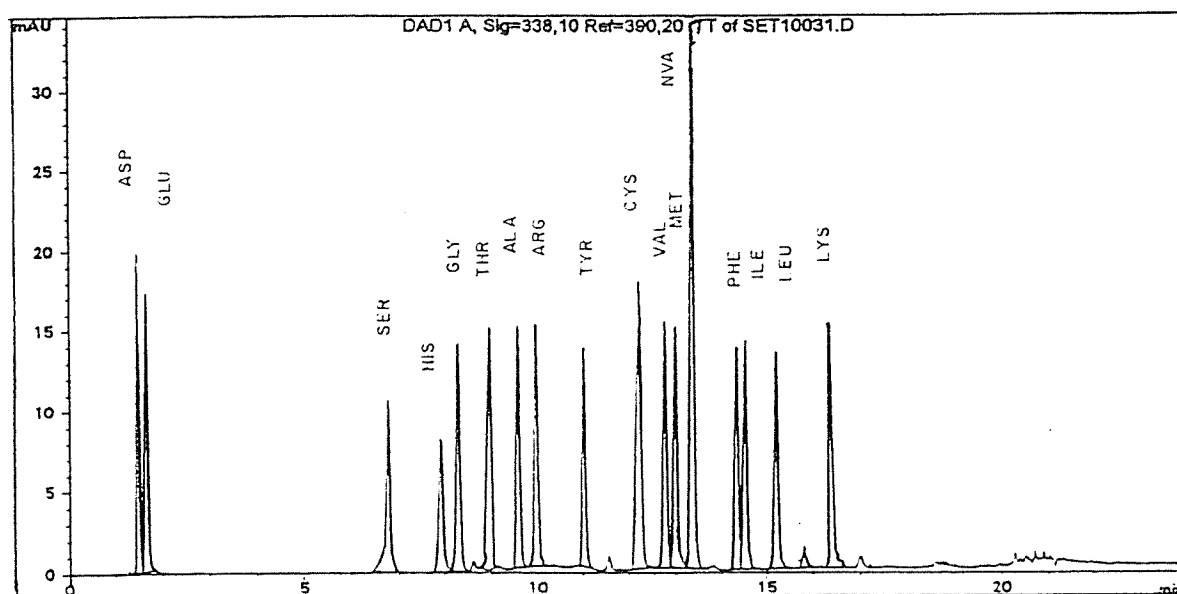


Figura 4. Estándar de aminoácidos. Segundo nivel de la curva de calibración a una concentración de 225 pmol. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.

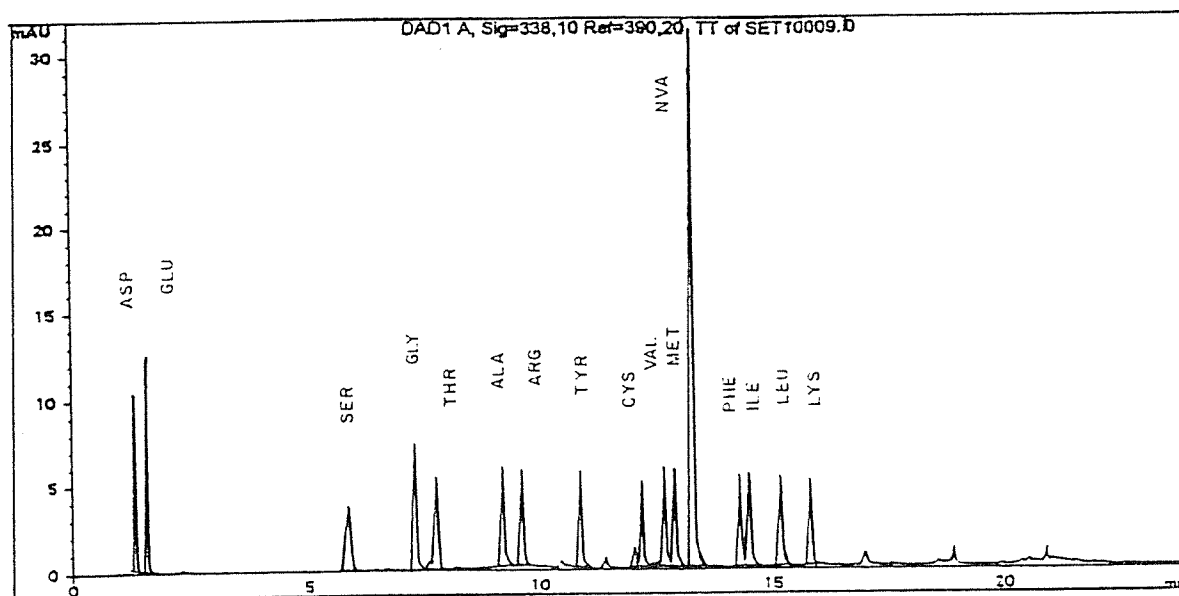


Figura 5. Estándar de aminoácidos. Tercer nivel de la curva de calibración a una concentración de 90 pmol. El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.

Con los reactivos de derivatización, se obtuvo que el OPA funcionó adecuadamente cuando estaba fresco. Su tiempo de vida es limitado y una vez abierta la ampollita, el reactivo está expuesto a degradarse fácilmente. La figura 6 muestra un perfil de aminoácidos con problemas de degradación del derivatizador de OPA. El reactivo elaborado en el laboratorio tuvo el inconveniente de ser fácilmente cristalizado y degradado, de tal manera que nos impidió obtener resultados positivos.

La derivatización con FMOC para aminoácidos secundarios dio resultados favorables al observar los perfiles de aminoácidos obtenidos en las muestras. Es importante mencionar que cuando el reactivo OPA se encuentra degradado, la derivatización con FMOC es ineficiente, como puede observarse en la figura 6.

Cuando la resolución de los picos empezó a disminuir, se observó que los reactivos de tetrahidrofuran (THF) y trietilamina (TEA) empezaban a degradarse, sin embargo recobran sus propiedades al ser destilados. Las figuras 7 y 8 muestran un perfil de aminoácidos donde tanto la concentración de THF como TEA, respectivamente, son bajas a consecuencia de la degradación.

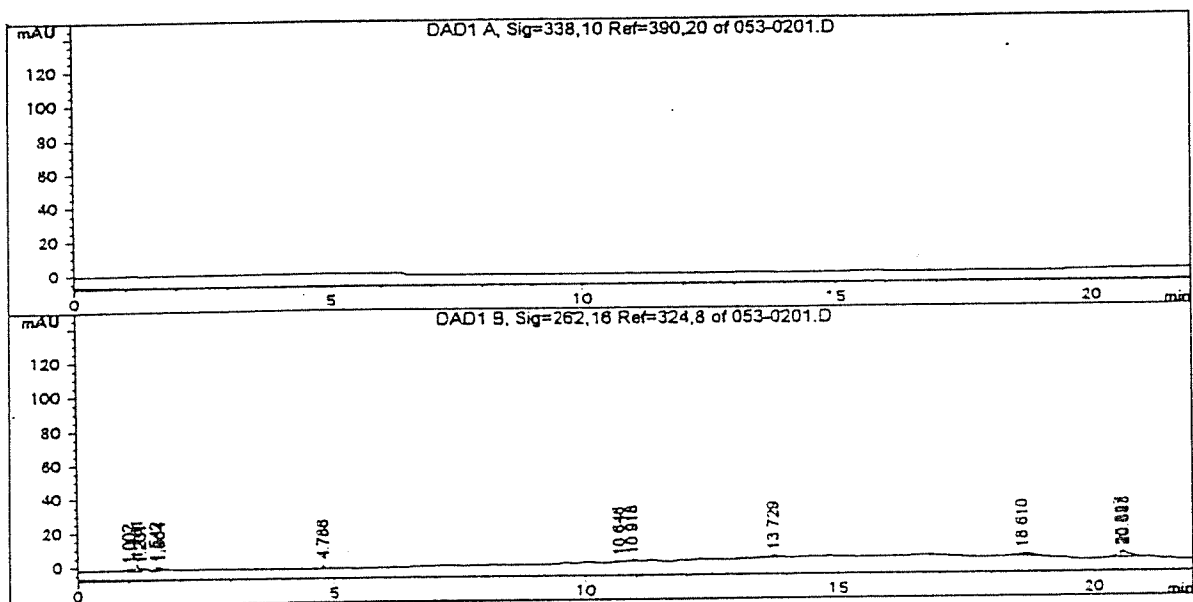


Figura 6. Corrida con ausencia de derivatización de aminoácidos primarios por degradación del OPA. El análisis se realizó mediante HPLC Win HP-1090.

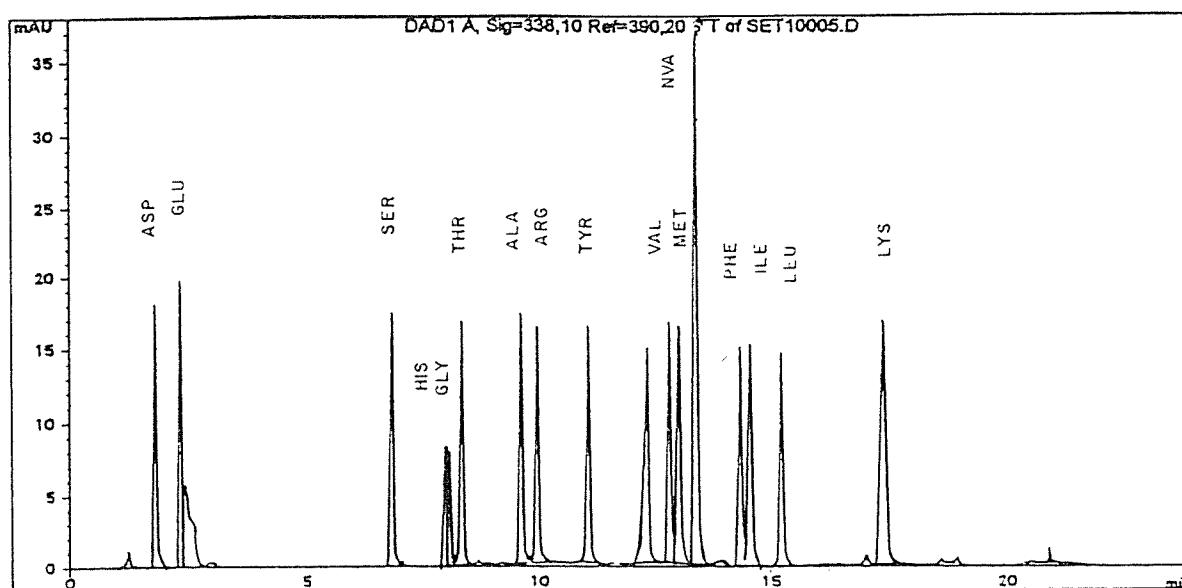


Figura 7. Corrida con tetrahidrofuran (THF) degradado resultando en una pobre resolución. El análisis se realizó mediante HPLC Win HP-1090 con prederivatización de OPA.

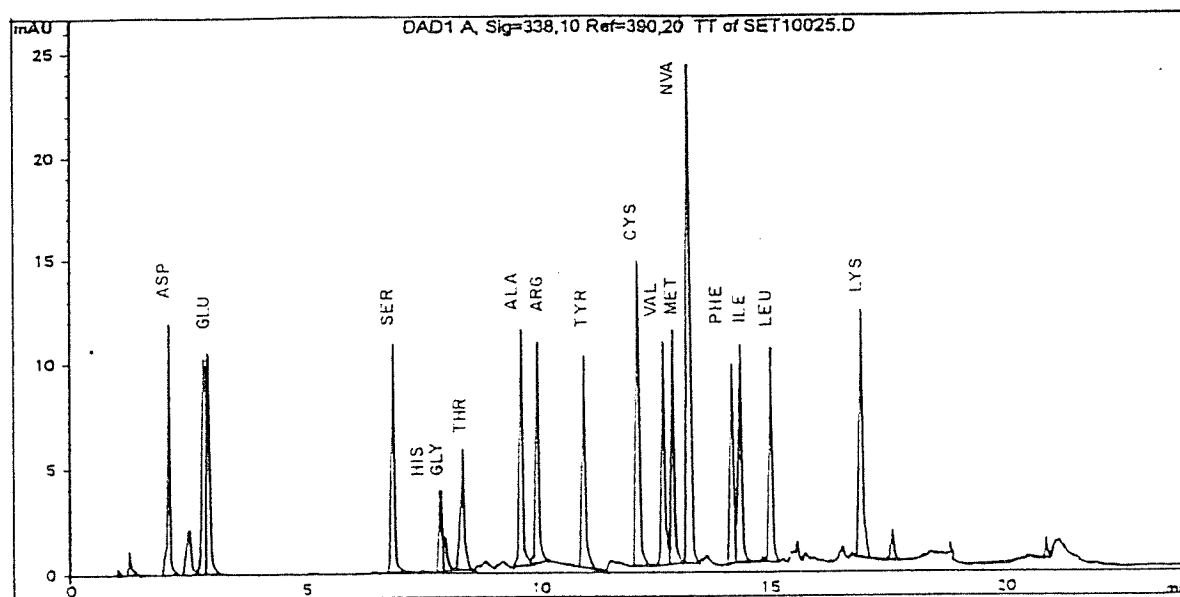


Figura 8. Corrida con trietilamina (TEA) degradada resultando en una pobre resolución.

El análisis se realizó mediante HPLC HP-Win 1090 con prederivatización de OPA.

Al observar el efecto de las dietas elaboradas con ensilaje crudo (CR) y cocido (CO), en el crecimiento de los juveniles de abulón, después de 140 días de alimentación, se pudo notar un crecimiento total con CR de 25.5 a 27.8 mm, mientras que los alimentados con CO crecieron de 25.9 a 28.7 mm (Tabla III). Entre tratamientos se observó un mayor crecimiento significativo para el tratamiento CO los días 56 y 84 ($P < 0.05$). Para el peso total se vio, que con la dieta CR los abulones crecieron de 2.15 a 2.77 g durante 140 días, mientras que para la dieta CO crecieron de 2.24 a 3.04 g. Entre tratamientos se observó un mayor crecimiento significativo para la dieta CO los días 84 y 112 ($P < 0.05$).

La tasa de crecimiento en longitud y tasa de crecimiento específico fueron similares (Tabla IV), a excepción del día 84 donde ambas tasas de crecimiento fueron significativamente mayores para la dieta CO ($P < 0.05$).

Tabla III. Crecimiento total en longitud y peso de juveniles de abulón alimentados durante 140 días con la dieta balanceada CR y CO. El error estándar está indicado dentro del paréntesis.

CRECIMIENTO TOTAL	Días	DIETA		P
		CR	CO	
mm	0	25.5(0.2)	25.9(0.2)	0.2275
	28	26.1(0.3)	26.7(0.2)	0.1671
	56	26.6(0.1)	27.1(0.1)	0.0397
	84	27.1(0.2)	27.9(0.2)	0.0354
	112	27.6(0.3)	28.4(0.3)	0.0934
	140	27.8(0.3)	28.7(0.3)	0.1090
g	0	2.15(0.05)	2.24(0.04)	0.1887
	28	2.28(0.03)	2.37(0.04)	0.1807
	56	2.45(0.06)	2.57(0.04)	0.1648
	84	2.52(0.06)	2.73(0.04)	0.0469
	112	2.61(0.06)	2.93(0.09)	0.0402
	140	2.77(0.08)	3.04(0.09)	0.0843

Tabla IV. Tasas de crecimiento de juveniles de abulón alimentados durante 140 días con el alimento balanceado CR y CO. El error estándar se indica dentro del paréntesis. Subíndices con letras diferentes indica diferencias significativas para cada tratamiento a través del tiempo.

TASA DE CRECIMIENTO	Días	DIETA		P*
		CR	CO	
µm/día	0	—	—	
	28	20.2(4.8)a	28.6(0.0)a	0.100
	56	16.7(6.0)a	14.3(4.1)b	0.759
	84	19.0(2.4)a	28.6(2.1)a	0.039
	112	16.7(5.2)a	16.7(4.3)b	1.000
	140	9.5(2.4)a (P** = 0.502)	10.7(2.1)b (P** = 0.004)	0.725
TCE %/día	0	—	—	
	28	0.19(0.03)b	0.19(0.03)a	0.945
	56	0.26(0.04)b	0.30(0.02)a	0.449
	84	0.10(0.02)a	0.22(0.03)a	0.020
	112	0.14(0.04)b	0.24(0.05)a	0.154
	140	0.20(0.03)b (P** = 0.038)	0.14(0.01)b (P** = 0.037)	0.200

TCE (Tasa de crecimiento específico) = $100 \{ (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días de experimentación} \}$.

*valor de P entre tratamientos para cada tiempo

** valor de P para cada tratamiento a lo largo del experimento

DISCUSION

En los resultados obtenidos del perfil de aminoácidos entre las dietas experimentales se demostró haber diferencias en el porcentaje de aminoácidos. En el tratamiento **CO** se observó que seis aminoácidos fueron encontrados en mayor porcentaje que en **CR**. De los cuales dos corresponden a aminoácidos esenciales (metionina y lisina). Al contrario de lo esperado, seis aminoácidos esenciales fueron encontrados en mayor proporción en el alimento **CR** (histidina, treonina, valina, fenilalanina, isoleucina y leucina). Cabe aclarar que el noveno aminoácido esencial, el triptofano, no fue determinado, pues es sumamente sensible a las condiciones ácidas; por lo que su determinación requiere de una hidrólisis alcalina (Chicz y Regnier, 1990).

Los perfiles de aminoácidos obtenidos en este trabajo, correspondieron a las muestras de 24 h de hidrólisis, con lo cual resulta imposible hacer una regresión al tiempo cero para calcular el porcentaje correcto de la serina y treonina, ya que estos aminoácidos son altamente reactivos debido a su grupo carboxilo (Chicz y Regnier, 1990). En ambos alimentos la cantidad de serina fue relativamente similar, mientras que la treonina fue más alta en el **CR**. Debido a que la determinación de ambos aminoácidos es incierta, no puede llegarse a ninguna conclusión al respecto. Por otro lado, debido a la rápida degradación del reactivo de OPA, fue imposible realizar un mayor número de muestras, por lo que no podemos mencionar si dichas diferencias encontradas fueron o no significativas, diferencias que serán referidas como aparentes.

Los aminoácidos aquí presentados corresponden a porcentajes de aparición en el total de la muestra, resultando en el 100% de aminoácidos contenidos. El aminoácido que resultó con una mayor diferencia entre ambas dietas, fue la glicina (19.54 % para **CR** vs 3.39 % para **CO**), considerado como uno de los aminoácidos más estables (Creighton, 1993). Esto indica una mayor degradación de aminoácidos en **CR**. El siguiente aminoácido con mayor diferencia fue la lisina, con 1.48 % para **CR** vs 8.86 % para **CO**, contrario a lo ocurrido con la glicina. La lisina es un aminoácido esencial y limitante en la mayoría de las dietas y es por ello que se requiere en una alta proporción dentro de una dieta. (Shimada, 1983). De acuerdo con Belitz y Grosch (1987) en carne y huevos la lisina se encuentra entre un 7-9 %, en cereales entre un 2-4 %, mientras que en proteína de pescado hasta en un 11 %. Este porcentaje es mayor que el obtenido para **CO** (8.86 %) (ver Tabla II), y más aún para **CR** (1.48 %). Lo cual demuestra que la lisina se vio seriamente afectada con la conservación del ensilaje crudo, probablemente debido a la degradación enzimática de las enzimas endógenas presentes en las vísceras del pescado (Gildberg, 1982; Espe, 1993). Esto puede explicarse porque en el tratamiento **CO** se observa un mayor crecimiento de los juveniles de abulón, que en **CR** en algunos niveles de tiempo (Tabla III). La posible reducción de la lisina en el **CR**, se debe quizás a que su grupo ϵ - libre es sumamente reactivo (Belitz y Grosch, 1987).

La metionina es un aminoácido muy sensible en presencia de oxígeno y calor (Belitz y Grosch, 1987), por lo que no explica el que se haya encontrado en un mayor

porcentaje en CO, ya que este tratamiento fue expuesto al calor (Tabla II). Generalmente en carnes la metionina se encuentra de 2 a 4 %, porcentaje muy similar al obtenido aquí.

La histidina se encuentra en muchas proteínas entre el 2 y 3 %, y es considerada como un aminoácido relativamente estable en un medio ácido. Sin embargo, se reporta generalmente como limitante en ensilajes ácidos de pescado (Raa y Gildberg, 1982). Esta aparente incongruencia se debe probablemente a que la histidina es degradada fácilmente por microorganismos descomponedores a pHs neutros o alcalinos, de tal manera que si la materia prima a ensilar no se encuentra en aceptable estado de frescura, ésta se encontrará degradada a histamina (Raa y Gildberg, 1982). En este trabajo se encontró que la histidina en el alimento CR fue mayor que en el CO (1.16 y 0.46 %, respectivamente), donde la única diferencia fue el proceso de calentamiento inicial.

Se sabe que la hidrólisis de proteína afecta seriamente el nivel nutricional en el ensilaje. De tal manera, que se han observado diferencias significativas entre alimentar ratas y salmón con ensilajes frescos y de más de 90 días (Espe et al., 1992). En el presente trabajo la hidrólisis enzimática fue detenida mediante el calentamiento de la materia prima. Dicho calentamiento aún cuando no rebasó los 60°C, pudo haber dado lugar a algún cambio en la estructura secundaria de las proteínas, favoreciendo entonces la degradación de ésta por los ácidos. Viana et al. (1993) demostraron que mediante el calentamiento se pudo reducir en un 20 % el porcentaje de líquido, referido como un índice de hidrólisis e indicando que la hidrólisis de la proteína es detenida sólo parcialmente. Se piensa que es

importante el detener la hidrólisis ya que se ha demostrado que los aminoácidos contenidos dentro de cadenas polipeptídicas sufren menor degradación que los terminales o libres (Raa y Gildberg, 1982). Sin embargo, en el presente trabajo el tratamiento CO no resultó en un incremento significativo en el crecimiento a lo largo del experimento. Quizás, ocasionado por la degradación de importantes aminoácidos esenciales y/o limitantes que seguramente influyen de manera significativa en el crecimiento del abulón. Estos resultados no coinciden con lo observado por Espe (1992), donde un menor porcentaje de hidrólisis resultó en un incremento significativo en el crecimiento. Esto indica que el calentamiento como método de reducción de la hidrólisis en un 20 % no fue suficiente para obtener un crecimiento satisfactorio en juveniles de abulón (*H. fulgens*) (Viana et al., 1993). Por otro lado la similitud entre tratamientos puede deberse a una gran variabilidad entre el crecimiento de los organismos enmascarando posibles diferencias. Los promedios obtenidos muestran mayor crecimiento para CO a lo largo del experimento con errores estándar que llegan a corresponder hasta un 26 % del valor (Tabla IV).

Con respecto al método de Amino Quant, puede decirse que es una técnica relativamente sencilla en cuanto a su aplicación. Sin embargo, requiere de un manejo adecuado principalmente de los reactivos, no sólo en el laboratorio, sino en el envío de los mismos a través de las casas comerciales.

No se pudo llevar a cabo el análisis de todas las muestras propuestas, debido a la falla del reactivo de OPA, elemento indispensable para la derivatización de los aminoácidos primarios y por ende, cuantificación de los aminoácidos libres (Chicz y Regnier, 1992). El grupo de aminoácidos primarios (20 aminoácidos esenciales y no esenciales), reaccionan con el orto- ftalaldehído en presencia del ácido 3,3-mercaptopropiónico con un pH alrededor de 10 para formar un derivado isoindol. Aquí el grupo de aminoácidos secundarios no reacciona, a diferencia del derivado isoindol que es fluorescente, el cual es detectado por un detector de arreglo de diodos para una sensibilidad estándar a 338 nm. El reactivo OPA de Amino Quant, en forma de ampollitas de 1 ml, es sumamente inestable, y una vez abierta la ampollita debe mantenerse bajo refrigeración y libre de oxígeno para así conservar sus propiedades. La degradación del OPA ocurre rápidamente aunque pueden detectarse varios pasos, empezando por una desestabilización de la línea base, hasta llegar a una condición extrema en pocas horas, como lo muestra la figura 6 (a). Los reactivos utilizados fueron de Amino Quant, con un alto valor comercial, es por esto la importancia de lograr una técnica que nos permita la obtención de reactivos a un costo menor. Con todos los ingredientes necesarios en el presente trabajo, se intentó preparar el reactivo de OPA sin obtener un resultado satisfactorio. Esto aparentemente por la baja solubilidad del mismo. La reacción de derivatización debe llevarse a cabo a un pH cercano a 10.

El FMOC es el reactivo para derivatizar los aminoácidos secundarios, cuyo grupo amino no se encuentra libre, reacción que se lleva a cabo con 9-fluorenylmethyl

chloroformato (FMOC) a un pH cercano a 10.0 para formar aminoácidos secundarios. Estos productos son fluorescentes, y el método cromatográfico asegura que los aminoácidos que no se derivaticen sean eluidos después de haber salido los secundarios, evitando la interferencia de ambos. Estos aminoácidos son también detectados por un detector de arreglo de diodos con una sensibilidad estándar de 1 pmol. Cuando el reactivo de OPA no se encuentra en buen estado, la derivatización secundaria se ve también afectada como se observa en la Figura 6 (b).

Además de los derivatizadores también es importante contar con el buen estado de los solventes orgánicos utilizados en la fase móvil. Con esto, nos referimos al acetonitrilo y metanol, los cuales son los encargados de regular las condiciones a una escala mayor por ser los acarreadores de los compuestos derivatizados. Mientras que el tetrahidrofuran y la trietilamina son los encargados de proporcionar la resolución de los picos. Estos dos últimos son con los que se debe tener un mayor cuidado, ya que fácilmente son degradados al volatilizarse. Un ejemplo de éstos dos últimos puede verse en las figuras 7 y 8, respectivamente. Cuando el tetrahidrofuran (THF) ya sufrió una degradación, se carece de una buena resolución, además de presentar áreas muy similares entre los aminoácidos, es decir, se pierde la proporcionalidad entre ellos. Efecto que se puede observar a lo largo de todo el cromatograma, siendo éste más marcado entre los picos de serina, tirosina, y ácido glutámico donde el último de éstos tiende a separarse en dos picos (Hewlett-Packard, 1990). La degradación de la trietilamina (TEA) afecta a los aminoácidos primarios donde su principal problema radica en la resolución de los

compuestos que eluyen en los primeros 5 minutos. Después de éstos 5 minutos, los aminoácidos afectados son la histidina, glicina y tirosina. Esta última, eluye un poco antes de tiempo. Ambos reactivos (THF y TEA) una vez degradados pueden ser fácilmente destilados para así recobrar sus propiedades, lo cual facilita su optimización.

CONCLUSIONES

El perfil de aminoácidos esenciales se vio afectado por el grado de hidrólisis, donde el alimento CO presentó valores porcentuales mayores en los aminoácidos esenciales; lisina y metionina.

El elevado grado de hidrólisis de las proteínas en el CR dio por resultado un mayor porcentaje de aparición de los aminoácidos estables, como la glicina.

El tratamiento CO presentó un mayor crecimiento en algunos niveles de tiempo, aunque en general, el crecimiento no se vio significativamente afectado por el grado de hidrólisis de los ensilajes.

La técnica de Amino Quant resultó ser efectiva para la determinación de los perfiles de aminoácidos. Algunos reactivos empleados presentaron problemas de degradación, dificultando el análisis continuo de muestras.

LITERATURA CITADA

Austreng, E. (1982) Ensilerde fiskeavfall i fiskeoppdrett. **En:** Husdyrforsøksmøtet.

Aktuelt fra statens fagtjeneste for landbruket, NLH, Ås, Norway, 1:525-530

Backhoff, H. P. (1976) Some chemical changes in fish silage. **J. Fd. Technol.** 11: 353-363.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1987) Amino Acids, Peptides, Proteins **En:** Food Chemistry. Springer Verlag (1a Ed.), 7-72 pp.

Brown, M.L. (1990) **Present Knowledge in Nutrition.** International Life Sciences Institute Nutrition Foundation. 6a Ed. Washington, D.C. 532 p.

Chicz, R.M. y Regnier, F.E., (1990) High-Performance Liquid Chromatography: Effective Protein Purification by Varios Chromatographic Modes. **En:** Guide to Protein Purification (M.P. Deutscher ed.) **Methods in Enzymology.** Academic Press, INC. N.Y. 182:392-421.

Creighton, T. (1993) **Proteins, Structures and Molecular Properties,** Second edition, W.H. Freeman and Company, N.Y. 507 p.

Espe, M.; Haaland, H. y Njaa, L. (1992) Autolysed fish silage as a feed ingredient for atlantic salmon (*Salmo salar*). **Comp. Biochem. Physiol.** 103A(2):369-372.

Espe, M.; Lied, E. y Torrisen, K.R. (1993) Changes in plasma and muscle free amino acids in atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. **Comp. Biochem. Physiol.**, 105A(3):555-562

Fabenro, O. y Jauncey, K. (1995) Water stability, nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets. **Aquacultural Engineering**, 14:143-153.

Gildberg, A. (1982) Autolysis of fish tissue - General aspects. **Tesis para obtener el grado de Doctor scientiarum**, Universidad de Tromsø, Noruega, 112 p.

Guzmán del Prío, (1992) A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico.

En: S.A. Shepherd, M.J. Tegner y S.A. Guzmán del Prío (Eds.), **Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture.** Fishing News Books, Oxford, pp 341-360.

Hahn, K., (1989). Nutrition and growth of abalone. **En:** K. Hahn (Ed.), **Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods** CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 135-180.

Hammock, D.A. (1995) Protein. En: (V. Herbert; G.J. Subak-Sharpe ed.) **Total Nutrition**. St. Martin's Press. N.Y. 37-49 pp.

Hardy, R.W.; Shearer, K.D.; Stone, F.E.; y Wieg, D.H. (1983) Fish silage in aquaculture diets. **J. World Mariculture Soc.** 14: 695-703.

Hewlett Packard (1990) **Amino Quant, Series II, Operator's Handbook HP-01090-90025**. República Federal de Alemania.

Hugli, T.E. (1989) **Techniques in protein chemistry**. Academic press Inc. USA, 284-294 pp.

Kompiang, I. P.; Arifudin, R. y Raa, J. (1980) Nutritional value of ensilaged by-catch fish from Indonesian shrimp trawlers. En: J.J. Connell, (Ed.) **Advances in fish science and technology**. Fishing News Books Ltd, Farnham, Surrey, England, 349-352.

López, L.M., (1994) Desarrollo de dietas artificiales para abulones juveniles de *Haliotis fulgens* utilizando diferentes fuentes de proteína. Tesis de Maestría F.C.M., U.A.B.C., Ensenada, B.C. México.

Lovell, R.T. (1982) Fish Farming: Designing Protein Sources For Tomorrow's World.

En: (T.P. Lyon Ed.) **Biotechnology in the Feed Industry**. Proceedings of Alltech's Fifth Annual Symposium. 237-252 pp.

Murray, R.K.; Mayes, P.A.; Granner, D.K. y Rodwell, V.W. (1990) **Harper's Biochemistry**. 20a Ed. a LANGE medical book, Appleton y Lange, Ca., 720 p

Raa, J. (1980) **Utilization of Fish By-Cath Fish on Shrimp Trawlers**. *Report to FAO* (Fisheries Department) Based on a visit to Thailand and Malaysia during September 1980. 30 p.

Raa, J. y Gildberg, A. (1982) Fish Silage: A review. En: CRC (eds.) **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 116:343-419

Raa, J.; Gildberg, A. y Strøm, T. (1983) Silage Production-Theory and Practice. En: D.A., Leward,; A.V., Taylor; y R.A., Lawrie (Eds.) **Upgrading Waste for Feeds and Food**. Butterworths. 8:117-132.

Sarwar, G. y Botting, G. (1993) Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important aminoacids in food and physiological samples. **J. of Chromatography**. 615:1-22.

Shimada, A. (1983) Fundamentos de Nutrición Animal Comparativa. 1a. Ed. Sistema de Educación continua en producción animal en México, A.C. México, D.F. 375 p.

Simpson, B. J., (1995). An investigation of diets of diet management strategies for the culture of the south african abalone, *Haliotis midae*. Tesis de Maestria, Universidad del Cabo, Sudáfrica, 80 pp.

Steel, R.G. y Torrie, J.H. (1988) Principios y procedimientos En: (McGraw Hill Ed.) Bioestadística. 2ªed.. 622 p.

Stone, F.E.; Hardy, R.W.; Shearer, K.D. y Scott, T.M. (1989) Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Aquaculture*, 76:109-118.

Tacon, A.G.J., (1989). Nutrición y Alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación, FAO-Italia. Proyecto Aquila II. Documento de Campo 4 GCP/RLA/102/ITA, 572 pp.

Uki, N., Kemuyama, A. y Watanabe, T., (1985). Nutritional evaluation of several protein sources in diets for abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51:1835-1839.

Uki, N. y Watanabe, T., (1992) Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis spp.*) and development of more efficient artificial diets. En: S.A. Shepherd, M.J. Tegner y S.A. Guzmán del Prío (Editors), **Abalone of the World**. Biology, Fisheries and Culture. Fishing News Books, Oxford, pp. 504-517.

Uki, N., Kemuyama, A. y Watanabe, T., (1985) Nutritional evaluation of several protein sources in diets for abalone *Haliotis discus hannai*. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, 51:1835-1839.

Viana, M.T. (1982) Una alternativa a la utilización de subproductos de la fauna de acompañamiento del camarón. Composición química de microensilajes de subproductos pesqueros y desperdicios agrícolas. Tesis para obtener el título de Bióloga. México, D.F. U.N.A.M. 55 p.

Viana, M.T. Nava, C. y Solana-Sansores R. (1993) Ensilajes ácidos de pescado. Efecto de precalentamiento y de la adición de ácidos fosfórico y cítrico sobre su calidad bioquímica. **Ciencias Marinas**, 19(4): 415-433.

Viana, M.T., López, L.M., García-Esquivel, Z., y Méndez, E. (199). The use of silage made from fish and abalone viscera as an ingredient in abalone feed. **Aquaculture**, (en prensa).

Zar, J.H. (1984) **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 718 pp.