

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



Uso de levaduras marinas *Debaryomyces hansenii*, administradas en microdietas elaboradas con Concentrado de Proteína de Soya para el destete de larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL TÍTULO DE
LIC. EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

LIZETH ADARELY VEZ BLANDÓN

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA A JUNIO DE 2021

Resumen

El uso de levaduras marinas como coadyuvantes en el aprovechamiento de dietas inertes a base de ingredientes de origen vegetal ha tomado un gran interés en la industria acuícola, el cual logra reducir costos de producción en los cultivos larvarios de peces con importancia comercial. Las microdietas toman gran interés en este aspecto ya que se logran obtener mejoras en el crecimiento y supervivencia de las larvas de peces marinos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar el uso de la levadura *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) como coadyuvante, en el aprovechamiento de la proteína de soya en dietas para larvas y juveniles de totoaba. En este estudio se realizaron 9 microdietas a base diferentes niveles proteína de soya en sustitución parcial de la harina de pescado y adicionadas con levadura ((dieta control D1, (HP100-L0 % (D1), HP100-L1 % (D2), HP100-L2 % (D3), CPS10 %-L0 % (D4), CPS10 %-L1 % (D5), CPS10 %-L2 % (D6), CPS20 %-L0 % (D7), CPS20 %-L1 % (D8), CPS20 %-L2 % (D9)). Demostrando que con un porcentaje de inclusión del 1 % de la levadura *D. hansenii* en microdietas para larvas de *Totoaba macdonaldi* otorgó mejores beneficios a éstos, en comparación a las otras dietas. En este trabajo, se discuten los mecanismos que pudieran estar implicados en el efecto probióticos en las larvas de Totoaba.

Palabras clave: *Debaryomyces hansenii*, levaduras marinas, microdietas, Concentrado de proteína de soya, fuentes proteicas vegetales, *Totoaba macdonaldi*, larvas, destete, maduración sistema digestivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



TESIS

USO DE LEVADURAS MARINAS *Debaryomyces hansenii*, ADMINISTRADAS EN
MICRODIETAS ELABORADAS CON CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SOYA PARA EL
DESTETE DE LARVAS DE TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*)

Presentada por:

Lizeth Adarely Vez Blandón

Aprobada por el comité:

Dr. MARIO ALBERTO GALAVIZ ESPINOZA

Presidente del Jurado

Dra. LUS MERCEDES LOPEZ ACUÑA
Sinodal Propietario

Dr. TOVAR RAMÍREZ DARIEL
Sinodal Propietario

Dr. FERNANDO BARRETO CURIEL
Sinodal Propietario

Dr. SANCHEZ SERRANO SAMUEL
Sinodal Propietario

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

JUNIO de 2021

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) que me dio una segunda oportunidad por culminar una carrera académica profesional.

Gracias a la Facultad de Ciencias Marinas, que creo, no se puede igualar a ninguna otra facultad. Su calidez y confianza entre el personal docente y administrativo es inigualable.

Al fondo SADER-CONACyT 247698, DE LA CONVOCATORIA 2017-4 de FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACyT” por haberme apoyado con la beca económica para realizar la presente tesis.

Gracias a mi director de Tesis Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza, profe gracias por confiar en mí y darme la oportunidad en esta etapa de mi carrera siendo una persona muy paciente y darse el tiempo de atendernos como alumnos con cualquier duda.

Gracias a cada uno de los miembros del comité de tesis: Dra. Lus M. López Acuña, Dr. Dariel Tovar Ramírez, Dr. Samuel Sánchez Serrano y Dr. Fernando Barreto, gracias a cada uno de Ustedes por brindarme sus conocimientos y revisión del presente trabajo.

Gracias al personal del Laboratorio de Nutrición Acuícola de la FCM, Samantha Victoria, agradezco tu apoyo, así como pasar buenos ratos dentro del laboratorio con Natalia, gracias chicas.

Gracias a los profesores que estuvieron apoyándome en cada paso de mi formación y de mi tesis para poder escalar con este trabajo. Gracias profe Samuel Sánchez, Fernando Barreto.

Dedicatoria

A toda mi familia en especial a mis padres Verona y Rodolfo les agradezco el esfuerzo y su tiempo por cuidar de nosotros para llegar a ser mejores personas, en lo personal y profesional, los amo con todo mi corazón.

Gracias a cada uno de mis hermanos, Edson, Lesly, Saúl, Arely que en su momento me brindaron su apoyo.

Gracias a mi novio Dante por siempre apoyarme también en mis decisiones profesionales y personales, te agradezco todo tu apoyo y estar al pendiente de mí siempre te amo.

A mis pequeños Valentina, Sebastián, Ximena y Kathy, los quiero mucho, gracias por esas palabras al irme de casa, en donde me decían que me cuidara y pusiera atención al profesor.

Y gracias a mí por nunca rendirme y ser perseverante ante todas las circunstancias.

Tabla de contenido

RESUMEN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
TABLA DE CONTENIDO.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1.2 ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA	9
1.1.3 HARINA DE PESCADO.....	9
1.1.4 SUSTITUTOS DE HARINA DE PESCADO	10
1.1.5 CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SOYA	11
1.1.6 MICRODIETAS.....	12
1.1.7 USO DE PROBIÓTICO EN ETAPAS TEMPRANAS	13
1.1.8 USO DE LEVADURAS MARINAS CONSIDERADAS COMO PROBIÓTICOS	13
1.1.9 GENERALIDADES DE ESPECIE <i>TOTOABA MACDONALDI</i>	14
1.1.10 MORFOLOGÍA DE LA ESPECIE.....	15
1.1.11 ETAPAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO Y DE VIDA LIBRE DE TOTOABA	15
2. ANTECEDENTES	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPOTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1 FORMULACIÓN DE DIETAS EXPERIMENTALES.....	22
6.2 DISTRIBUCIÓN DE ORGANISMOS EN LABORATORIO	23

6.3	Preparación de extracto enzimático	24
6.4	Cuantificación de la proteína soluble.....	24
6.5	Cuantificación de la actividad enzimática digestiva.....	25
6.6	Unidades de actividad enzimática	25
6.7	ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES.....	26
6.7.2.1	Preparación de las muestras	26
6.7.2.2	Proteínas totales.....	26
6.7.2.3	Lípidos totales.....	27
6.7.2.4	Humedad y Cenizas	28
6.7.2.5	Almidón.....	29
6.8	ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS (AAs).....	29
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
8.	RESULTADOS	31
8.1	ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL	31
8.2	PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE MICRODIETAS	32
8.3	PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DETERMINADOS PARA EL DESTETE DE LARVAS DE <i>T. MACDONALDI</i> A BASE DE MICRODIETAS ELABORADAS A BASE DE CPS Y LEVADURA.....	33
8.4	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LARVAS DE TOTOABA.....	36
9.	DISCUSIÓN.....	39
10.	CONCLUSIONES.....	45
11.	LITERATURA CITADA	46

Índice de tablas

1. Composición de dietas experimentales.	23
2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de levadura correspondiente para cada dieta.	23
3. Análisis químicos proximales de las dietas experimentales.	31
4. Composición total de aminoácidos de las dietas experimentales (mg/g de materia seca).	32
5. Valores promedio (\pm desviación estándar) de los parámetros de crecimiento e índices productivos de larvas de <i>Totoaba macdonaldi</i> para evaluar el uso de levadura como coadyuvante en el aprovechamiento del CPS en dietas con diferentes porcentajes de levadura y CPS.	34
6. Valores promedios (\pm desviación estándar) de la actividad enzimática digestiva al día 30 DDE en larvas de <i>Totoaba macdonaldi</i> para evaluar el uso de levadura como coadyuvante en el aprovechamiento del CPS en dietas con diferentes porcentajes de levadura y CPS. .	38
7. Valores promedios (\pm desviación estándar) de la actividad enzimática digestiva al día 40 DDE en larvas de <i>Totoaba macdonaldi</i> para evaluar el uso de levadura como coadyuvante en el aprovechamiento del CPS en dietas con diferentes porcentajes de levadura y CPS..	38

Índice de figuras

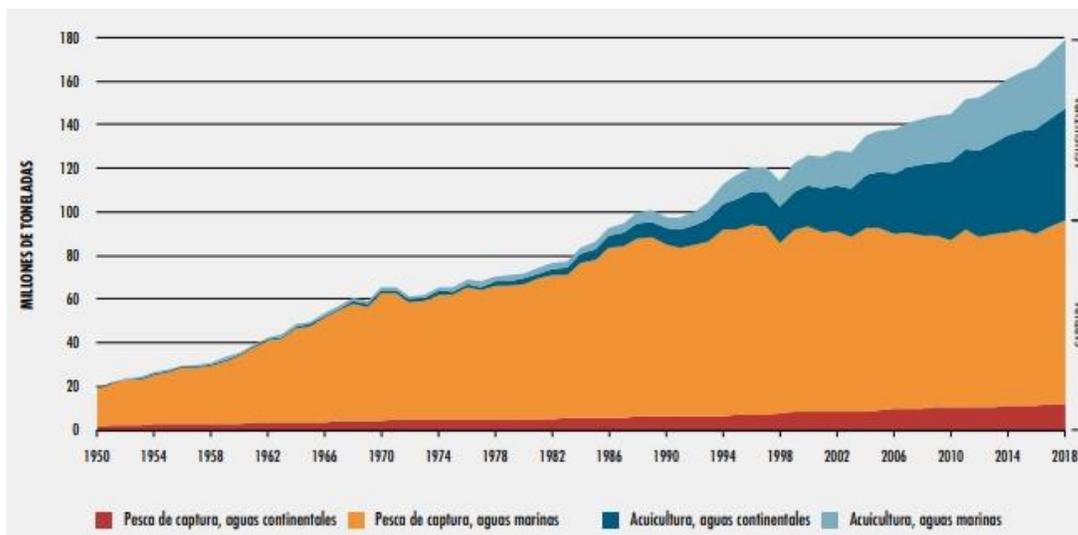
1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. Tomado de (FAO, 2020)	9
2. Elaboración de dietas. (A) Homogenización de ingredientes (B) secado de pellets (C) almacenado de la dieta	22
3. Proceso para proteínas totales: (A) reactivos y dieta triturada, (B) matraces microkjdhall en su proceso de digestión, (C) digerido aforado y envasado a 25 ml y (D) destilador kjeldahl.	27
4. Preparación de muestras: (E) T. ensayo con microdietas y Mix D.M.M (G) para su homogenización (F).	28
5. Proceso de filtrado y separación de fases. (H) Filtrado del solvente, (I) Separación de fases, (J) Evaporación de muestras en Thermoblock y (K) muestras evaporadas.	28

1. Introducción

1.1.2 Estado actual de la acuicultura

La acuicultura es una de las actividades agroalimentarias de mayor crecimiento en los últimos años, teniendo un crecimiento de 7.5% por año desde 1970. Este crecimiento emergente se debe a que la población del mundo sigue en aumento llegando a casi 10,000 millones de personas, lo cual ha rebasado la producción de alimentos generado por otras actividades agroalimentarias como la ganadería, agricultura y pesca (FAO,2020). Para el 2018 la producción mundial de pescado se estimó en 179 millones de toneladas las cuales 82 millones de toneladas procedieron de la actividad acuícola, 156 millones destinadas al consumo humano con lo que se estima un suministro anual de 20,5 kg per cápita. Los 22 millones restantes fueron destinados para el uso de materia prima principalmente para la producción de harina y aceite de pescado. La acuicultura representó un 46 % de la producción total y el 52 % del pescado para consumo humano (FAO, 2020).

Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. Tomado de (FAO, 2020).



1.1.3 Harina de pescado

La producción acuícola es cada vez mayor y esto quiere decir que la pesca tiene que solventar la alimentación de las especies acuícolas ya que el principal ingrediente que se comercializa es la harina y aceite de pescado, utilizado para la alimentación de los organismos terrestres y acuícolas. Estos ingredientes proceden mayormente de peces pelágicos menores como la sardina, anchoveta y macarela. Esta fuente de ingrediente ha solventado desde hace mucho tiempo cultivos como lo es el salmón, trucha, carpa, tilapia, camarón, entre otras especies. Dada la demanda que se tiene, la acuicultura no ha tenido el cambio radical en sustituir ingredientes animales por vegetales para el procesamiento de dietas acuícolas. No obstante, hay estudios en donde se implementa la harina de soya como fuente alterna proteica (Carillo *et al.*, 2018; Zhu, 2020). Dentro del Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal (CONAFAB), se estima que distintas empresas como, Malta Texo de México, S.A. de C.V., Nutrición Marina, S.A. de C.V. y Vimifos, S.A. de C.V., entre otras, producen aproximadamente 90% de alimentos balanceados para la acuicultura en México.

El uso de la harina de pescado como ingrediente en fabricación de dietas, es debido a que tiene un nivel alto de proteína (65-70%), alta digestibilidad, un alto contenido de aminoácidos esenciales, entre otras características, siendo un ingrediente indispensable para la elaboración de dietas para peces (Cárdenas de la Cruz ,2015). Sin embargo, este ingrediente puede ocasionar que los costos de producción de esta actividad asciendan hasta el 70%, así mismo, debido a estas características nutricionales ha sido difícil que se logre reemplazar en su totalidad.

1.1.4 Sustitutos de harina de pescado

Distintas fuentes proteicas de origen vegetal compiten para sustituir la harina de pescado en alimentos para la acuicultura, para disminuir este ingrediente se han realizado distintos estudios donde buscan reemplazar parcialmente o totalmente el porcentaje de proteína animal. La harina de yuca, harina de soya, concentrado de proteína de soya (CPS), gluten de maíz, gluten de trigo, hasta subproductos avícolas como la carne, huesos y plumas son algunos de los sustitutos que se pueden adicionar en dietas para peces. Oscilando con porcentajes de proteína desde el 25% en yuca, 44-46 % en harina de soya, 60% en gluten

de maíz y un 50% en estos subproductos avícolas. Algunos de estos tienen un alto porcentaje de proteína, pero poco digeribles (Carillo *et al.*, 2018; Loarte y luna, 2017; Piñeros-Roldan *et al.*, 2014).

La harina de soya es una de las alternativas más viables y estudiadas para ser utilizada en dietas para organismos acuícolas, esto debido a que tiene ciertas características que son aceptables para su uso en la acuicultura, entre ellos la disponibilidad en el mercado, valores aptos nutricionales como alto contenido proteico, alta digestibilidad, baja fibra, almidón, y la palatabilidad. Sin embargo, un problema que se ha detectado en el uso de la harina de soya como fuente de proteína, es que contienen altos niveles de factores anti-nutricionales (FAN), lo cual hace que la harina de soya no pueda incluirse en grandes cantidades en la formulación de los alimentos para peces carnívoros marinos (Madrid, 2019). Tal es uno de los casos en donde FAN como el inhibidor de tripsina en harina de soya causa efectos negativos, tales como un desorden/alargamiento en el crecimiento pancreático y como consecuencia no se obtienen ganancias de crecimiento esperadas en los organismos acuícolas (Barboza, 2016).

1.1.5 Concentrado de Proteína de Soya

La soya como ingrediente en la industria acuícola ha llegado ser de gran relevancia gracias a su alto contenido de proteína, en especial el CPS que en comparación con la harina de soya se logra mitigar FAN (inhibidor tripsina, lectina, saponina, oligosacáridos entre otros), a través de solventes (etanol acuoso o metanol) para su proceso de extracción haciéndolo un mejor ingrediente en dietas de organismos acuícolas. El CPS contiene alrededor de 600 g kg^{-1} de proteína cruda, sin embargo, la presencia de aminoácidos como la metionina y lisina en menor proporción que en la harina de pescado, son algunas de las limitantes que presenta el CPS para la elaboración de alimento para especies acuícolas (Minjarez-Osorio *et al.*, 2016; Zhu, 2020).

Sabiendo que la metionina y lisina forman parte de la composición de las proteínas que por ende son necesarios para la construcción muscular, éstas deben ser añadidas en cantidades adecuadas (1.0, 1.8% peso seco) en la elaboración de dietas para peces una vez que se

reemplaza la fuente proteica animal por fuentes alternas de proteína vegetal. La taurina es otro nutriente importante que debe de ser incorporado en dietas para peces carnívoros, ya que ésta participa en la emulsificación, absorción de las grasas y de las vitaminas liposoluble. La adición de esta sustancia azufrada no proteica llega a contrarrestar el síndrome del hígado verde (sobreproducción hemolítica de biliverdina), así como la degradación oxidativa de los lípidos (García *et al.*, 2010; López *et al.*, 2015).

1.1.6 Microdietas

No solo la harina de pescado llega a ser uno de los insumos más caros para la alimentación de peces, también el alimento vivo representa un costo alto de producción, así como la transmisión de enfermedades o parásitos a larvas de peces. Pero a pesar de estos factores siguen siendo el primer alimento exógeno (*Brachionus plicatilis* y el crustáceo *Artemia spp.*) en la alimentación de larvas de peces y crustáceos, al sustituir estos organismos por microdietas se reduce el crecimiento y la sobrevivencia en los cultivos larvarios (Mata, 2010). No obstante, se sabe que las larvas tienen la capacidad a partir de su primer alimento exógeno, de llevar a cabo el proceso de digestión y que el uso de estas microdietas puede atribuirse, no por ser poco digeribles para las larvas si no por no cumplir con los requerimientos nutricionales específicos (Blair *et al.*, 2003; García, 2000).

Algunos de los requerimientos que deben cumplir las dietas es llegar a captar la atención de las larvas (densidad adecuada en la columna de agua), tamaño de partículas adecuadas a la cavidad oral de la larva, con ingredientes altamente digeribles y estimular la presencia de enzimas digestivas que conlleve a una buena digestión y absorción de nutrientes. Algunos estudios demuestran que al incorporar estas microdietas en los cultivos larvarios y de no ser en tamaños adecuados, éstas pasan desapercibidas para las larvas ya que no son atraídas por estas partículas o simplemente no los ven, causando crecimiento limitado, así como mal pigmentación de ojos y piel. (Murray *et al.*, 2010; Mata, 2010). Este proceso de co-alimentación engloba generalmente un mejor rendimiento en lugar de utilizar solo la adición de microdietas o alimento vivo en el cultivo larvario, generando un mejor crecimiento y supervivencia (Kolkovski, 2008).

1.1.7 Uso de probiótico en etapas tempranas

Una de las etapas críticas en los cultivos de organismo acuícolas es el estadio larval, para lo cual, parte de su alimentación endógena debe ser rica en ácidos grasos y nutrientes esenciales, siendo su primera fuente de alimento (absorción saco vitelino y gota de aceite) y de gran importancia para su sobrevivencia y desarrollo. La administración de distintas dietas para el desarrollo de los organismos debe ser adecuada proporcionando los macro y micronutrientes apropiados para las distintas especies marinas (Morales, 1999).

Se han buscado alternativas para un mejor desarrollo ontogénico para lograr la maduración temprana o precoz del sistema digestivo, aunado a esto, distintos autores llegan a conclusiones que la inclusión de probióticos, entre ellos las levaduras vivas, cuentan con efectos benéficos en el desarrollo y crecimiento de la larva, así mismo, de manera indirecta logran reducir el uso de alimento vivo en etapa larvaria de peces y costos de producción (Tovar *et al.*, 2008; Mata, 2010).

El uso de probióticos en la acuicultura ha tomado un rol importante para el campo de la piscicultura. Distintos autores definen probiótico como aquellos microorganismos que sean ingeridos en cantidades adecuadas y se mantengan vivos en el tracto gastrointestinal confiriendo resultados positivos para la salud (Gatesoupe, 2000; Ochoa y Vázquez, 2004).

El uso incorrecto de antibióticos condujo a la generación de bacterias resistentes, de ahí que los probióticos han tomado importancia en los cultivos acuícolas. Aunque la definición antes descrita es actualmente la más correcta, también se relaciona el uso de probióticos para mejorar la calidad del agua, pero correlacionado con otorgar también a los organismos un medio externo benéfico. Se han usado probióticos humanos (*Lactobacillus rhamnosus*) para trucha arcoíris el cual le confiere una mejor sobrevivencia, pero pasado los días, estos microorganismos ya no son detectados en el tracto intestinal del pez. Por ello, se sugiere que estos microorganismos sean aislados de especies acuáticas hospedadoras de microorganismos potenciales como probióticos y que se mantengan constantes en su microflora intestinal (Vine *et al.*, 2006).

1.1.8 Uso de levaduras marinas consideradas como probióticos

Las levaduras son utilizadas como probióticos, siendo solo dos especies las que han sido utilizadas en peces, *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales tienen la capacidad de adherirse al mucus intestinal. La incorporación de estas levaduras marinas administradas en dietas microparticuladas tiene resultados benéficos tanto en la supervivencia de los organismos, como para la estimulación del sistema inmune, y la maduración del tracto digestivo. Las levaduras aportan moléculas llamadas poliaminas, que son indispensables para el buen funcionamiento de los organismos e involucradas en procesos de expresión genética (Reyes, 2008).

Debaryomyces hansenii se caracteriza por ser una de las levaduras marinas que toleran salinidades por arriba de 24 % en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* que es inhibida con 10%. Esta levadura se ha aislado de salmónidos como salmón del atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), destacando por su capacidad de adherirse y desarrollarse en el mucus intestinal, para después aportar poliaminas al hospedero. Esta gran ventaja, hace de ella, que la biotecnología la adopte en sus experimentos para obtener importantes efectos benéficos (Reyes, 2008).

Al incorporar estas levaduras al alimento favorece distintos procesos fisiológicos entre los que se encuentra la expresión de la colecistoquinina (CCK) así como la secreción de distintas enzimas endo y exopeptidasas que contribuirán al buen funcionamiento digestivo de los peces (Murashita *et al.*, 2008).

1.1.9 Generalidades de especie *Totoaba macdonaldi*

Una de las consideraciones en el cultivo de peces marinos es satisfacer la demanda alimenticia, por ello, el maricultivo, y cultivos en condiciones controladas son una de las razones rentables en consideración.

Hoy día la ganadería y la pesca están transitando por problemáticas como lo es la sobrepesca y el uso de grandes cantidades de consumo de agua para generar un kilo de carne, lo que convierte a la acuicultura y/o maricultura una de las actividades fundamentales para la humanidad, como lo es entre otras actividades necesarias. Un manejo inadecuado en estas actividades llega a tener efectos negativos, entre ellos, se

menciona la sobrepesca la cual hace que sean necesarias el uso de Normas para su veda e incluso establecerlas como permanentes en su caso *T. macdonaldi*. Su sobrepesca llevo a investigaciones las cuales tienen como objetivo el repoblar y recuperar la especie endémica del Golfo de California. Con ello la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, México establecieron estrategias para desarrollar un proyecto en el año 1998, el cual fue un reto, siendo una de las mayores limitantes la adquisición de reproductores y la escasa información de la biología de la especie para llevar a cabo su cultivo en cautiverio (True, 2012).

1.1.10 Morfología de la especie

Esta especie perteneciente a la familia Sciaenidae es caracterizada por poseer un cuerpo alargado, dorso poco elevado y una boca grande. En la madurez suelen presentar una coloración con tonalidad gris y en ciertos casos doradas y azules, mientras que los juveniles presentan manchas oscuras en su dorso. Es uno de los Sciaenidos que llegan a medir más de 1.30 longitud total y pesar hasta 100 kg. Estos organismos llegan a vivir entre 20 y 25 años llegando a ser sexualmente maduros entre los 7 años en hembras y 6 en machos, donde la hembra tiene un cuerpo mayor en talla y peso que los machos. Son peces carnívoros y en su hábitat natural se alimentan de pequeños crustáceos y peces. Su época de reproducción inicia a finales de febrero o principios de marzo con un periodo máximo de desove en mayo (Escudero, 2018).

1.1.11 Etapas de desarrollo embrionario y de vida libre de totoaba

En el desarrollo embrionario temprano de totoaba la mayor parte del cigoto está ocupada por vitelo (telolecítico), por lo que, su división llega ser meroblástica. La formación del notocordio, protuberancias y la zona caudal ocurren entre las 6 y 8 horas dando lugar al desarrollo embrionario medio (DEM). Durante el desarrollo embrionario tardío (DET) el saco vitelino está bien formado, se presentan lóbulos ópticos y se forma una membrana caudal que dará lugar a la aleta caudal. Este desarrollo concluye aproximadamente a las 20 horas de haber sido fecundado en donde el embrión está listo para eclosionar y llega a medir

alrededor de los 2mm. En etapa de vida libre presenta una barra de branquias, cerebro desarrollado, aletas pectorales, y ya con un estómago, el intestino madura presentando movimientos peristálticos, por lo general su primera alimentación exógena podría ser a las 62 horas, con una talla del organismo de 2512 μm (Morales, 1999). El tracto digestivo de totoaba cuenta con una cavidad oral, esófago, estómago, píloro, ciegos pilóricos, intestino y ano. Donde las funciones principales de digestión se llevan en el estómago e intestino, en este último se absorben los nutrientes ya digeridos por distintas enzimas. Estas enzimas son producidas principalmente en el estómago, páncreas e incluso en las paredes celulares del intestino. Las enzimas más importantes son las que participan en el intestino siendo las proteasas que son secretadas por el páncreas en forma de zimógenos y son activadas en el lumen del intestino mediante la enteroquinasa (enzima secretada por la pared intestinal). Las lipasas son importantes también en la digestión intestinal, ésta es secretada por el páncreas y activada por las sales biliares. Son de gran importancia ya que la digestión de estos lípidos es la principal fuente de energía. Otra enzima que participa en la digestión dentro del intestino son las amilasas, que son las encargadas de digerir algunos carbohidratos, sin embargo, en peces carnívoros no están tan activas como en los herbívoros. Pero se puede encontrar actividad tipo amilasa en peces carnívoros y tiene origen pancreático (Galaviz et al., 2015, Córdova-Montejo et al., 2020).

2. Antecedentes

Distintas industrias destinadas a la producción de alimento para la población humana, buscan minimizar costos con alternativas que satisfagan las necesidades de los organismos. Dentro del campo de la acuicultura, mediante experimentos empíricos se ha logrado reducir el porcentaje de proteína animal.

Sanz (2009) menciona que en trucha arcoíris se ha remplazado el 100% de proteína animal por proteína vegetal y en la lobina Europea se ha logrado remplazar hasta el 95%.

Zhan *et al.* (2019) evaluó el efecto del reemplazo de harina de pescado por CPS en juveniles de anguilas arroceras (*Monopterus albus*) observando que al ir incrementando los niveles

de CPS en las dietas de esta especie se encontraron factores favorables como la reducción de lípidos séricos (Triglicéridos, colesterol), crecimiento de musculo esquelético y un aumento en la enzima antioxidante catalasa. Encontrando mediante un análisis de modelo de línea discontinua (Broken line) que el nivel óptimo de CPS fue del 26%.

Murray *et al.* (2010) realizaron un experimento que consistió en evaluar mediante análisis morfo métrico e histológico (contenido intestinal) el uso de una dieta micro encapsulada producida por gelificación interna que contenía lecitina de soya, harina de calamar, levadura, harina y aceite de arenque, mezcla de aceite marino, vitaminas y minerales, buscando determinar la posibilidad de remplazar parcialmente el alimento vivo (*Artemia*) en larvas de halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus L.*). En este experimento, larvas con edad de 20 y 32 días fueron alimentadas con *Artemia* y dietas comerciales (Gemma micro, Skretting, Bayside, NB, Canadá), de su grupo control posteriormente se transfirieron por último larvas con 43 días de edad alimentadas a base de su dieta elaborada por gelificación interna. Las larvas de halibut mostraron en sus primeros 10 días de alimentación un intestino lleno al solo alimentarse con micro dieta; esto ocurrió cuando la dieta se introdujo a los 20 ó 32 días después de la primera alimentación, las larvas transferidas a los 43 días no consumieron bien la microdieta, probado por la presencia de solo un 30 % de intestino lleno. La micro dieta no cumplió con aspectos nutricionales adecuados ya que en larvas de halibut se ven afectados por aspectos cruciales como, desarrollo y migración ojo, desarrollo esquelético y pigmentación, que son aspectos cruciales en el crecimiento.

Curnow *et al.* (2006) hacen énfasis en la incorporación de microdietas por co-alimentación cuando las larvas de barramundi (*Lates calcarifer*) logran una longitud de 5 mm teniendo un destete más eficiente, mejorando el crecimiento hasta un 30 % y reduciéndose la mortalidad en el proceso (5 % al 1%).

Es por ello, que distintos estudios entre los que se encuentran bacterias potenciales como probióticos, las cuales, ayudan a la mejora del agua, resistencia contra patógenos y/o el crecimiento de peces cultivados, además de ayudar a la disminución o eliminación del uso de antibióticos en acuicultura (Apún ,2007; Vine et al., 2006).

Apún (2007) menciona que el suministro de bacterias potenciales como probióticos (Bacilos y lactococos) en el cultivo de tilapia ya sea adicionada en el alimento o en el agua mejora la supervivencia y el crecimiento de los organismos, aunque del total de cepas aisladas en este estudio solo se encontraron 7 cepas con potencial probiótico, entre las cuales lactococos predomina al ser un promotor de mayor ganancia de peso en los organismos.

Una de las características que favorecen el uso de levaduras marinas para la formulación de dietas en peces, es su grado de colonización que se logra en el tracto digestivo. Algunos estudios como Péres *et al.* (1997) menciona que el uso de espermina en la dieta de larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) indujo a una mejor maduración de las células epiteliales del intestino, así como la presencia enzimática comparada con su dieta control (alimento vivo). Pero el uso de levaduras (*D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula glutinis*) como probióticos en dietas para el destete de larvas de peces, se ha sugerido, que su adición al cultivo sea en su forma natural para que llegue a colonizar, sintetizar y secretar las poliaminas. Tovar y colaboradores (2008) resaltan distintos estudios en donde especies como (*D. labrax*, *O. mykiss*, *M. rosacea*), tienen efectos positivos al incorporar levaduras marinas (*D. hansenii*, *S. cerevisiae*) en dieta microparticulada comparando el potencial de adhesión en el mucus intestinal de los organismos y la maduración de su sistema digestivo, *D. hansenii* predominó y es característica además por estimular el sistema inmune, crecimiento, supervivencia y calidad larvaria en los organismos (Tovar *et al.*, 2002,2004; Waché *et al.*, 2006;Linares-Aranda, 2007).

El estudio por esta levadura marina tomo mayor interés al compararla con *S. cerevisiae*, en donde *D. hansenii* induce una sobreexpresión de enzimas y producción de metabolitos, es por ello, que la hace fisiológicamente más interesante (Ochoa y Vázquez, 2004).

Al incorporar *D. hansenii* al 1% en dietas para la lubina Europea (equivalente a 1.0×10^6 UFC g^{-1} de alimento), se observa un grado de colonización equivalente a 9.6×10^4 UFC recuperados. Con esta concentración de levaduras, se logró obtener una mayor actividad enzimática asociada al del borde de cepillo y a su vez, la maduración del tracto digestivo de esta especie (Ochoa y Vázquez, 2004).

Guzmán (2008) evaluó la inclusión de *D. hansenii* en su forma silvestre e inhibida en su actividad Ornitin descarboxilasa (ODC) sobre el desarrollo del sistema digestivo de larvas de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). En donde se presentó un aumento en su actividad enzimática digestiva y en la supervivencia, esto influenciado por el aporte de las poliaminas secretadas por la levadura en su forma silvestre. Y a pesar de inhibir a la enzima ODC no se alteró el crecimiento ni la producción de las poliaminas de *D. hansenii* incorporadas a las dietas para la cabrilla arenera.

En otro estudio Reyes y colaboradores (2008) administran la cepa *D. hansenii* (1.1%) en dietas para cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosácea*) en el cual someten a estrés siendo retada ante patógenos como (*A. ocellatum* y *A. hydrophila*). La inclusión de esta levadura refuerza el sistema inmune de los peces, una vez adherida en el intestino de la cabrilla sardinera. Esta capacidad de adhesión se puede deber a que esta levadura forma parte de la microbiota de otros teleósteos en su medio silvestre. Por todo lo anterior, el objetivo del presente estudio es evaluar la eficiencia alimenticia en larvicultura de *Totoaba macdonaldi* mediante la inclusión de dietas con proteína de soya enriquecidas con levadura marina (*D. hansenii*).

3. Justificación

Debido a que, en el cultivo de peces marinos, el mayor insumo de esta actividad es el uso de la harina de pescado como fuente principal de proteína, por lo que, los costos de producción afectan a la industria acuícola, ya que se requiere de estos ingredientes para la obtención de organismos con proteína de buena calidad. Es por esto la necesidad de buscar nuevas alternativas que puedan disminuir el uso de harina de pescado. Una opción viable es el uso de concentrado de proteína de soya (CPS) en dietas suplementadas con bacterias benéficas, que ayuden al desdoblamiento y aprovechamiento de este ingrediente por peces carnívoros marinos como una alternativa nutricional. Nuestro grupo de investigación en nutrición acuícola ha venido realizando estudios con proteína de soya en peces carnívoros, sin embargo, existen escasas investigaciones acerca del uso de bacterias probióticas como auxiliares en la posible digestibilidad de nutrientes y sobre todo en peces carnívoros en etapa larvaria, es por ello, que en el presente trabajo se evaluó el uso de la levadura marina, *Debaryomyces hansenii* como probiótico con y como coadyuvante en el aprovechamiento de la proteína de soya en dietas y su uso en la maduración de tracto digestivo de larvas y juveniles de totoaba.

4. Hipotesis

La incorporación de la levadura marina, *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) en dieta microparticulada con sustitución parcial de la harina de pescado por Concentrado de Proteína de Soya durante la etapa larvaria de *Totoaba macdonaldi*, tendrá un efecto positivo en el desarrollo y sobrevivencia en larvas y juveniles.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el uso de levadura marina *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) como coadyuvante en el aprovechamiento de la proteína de soya en dietas para larval-juvenil de Totoaba

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la respuesta en supervivencia, crecimiento y eficiencias alimenticias de larvas de totoaba cultivados con alimentos formulados con diferentes niveles de proteína de soya en sustitución parcial de la harina de pescado y adicionadas con levadura marina, *Debaryomyces hansenii*, como probióticos a nivel de laboratorio.
- Evaluar la actividad de enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina y leucina amonipeptidasa en larvas de totoaba al ser alimentados con dietas formuladas con diferentes niveles proteína de soya en sustitución parcial de la harina de pescado y adicionadas con levadura marina, *Debaryomyces hansenii*, como probióticos.

6. Material y Métodos

6.1 Formulación de dietas experimentales

Las dietas fueron formuladas y elaboradas con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (CPS) y levadura *D. hansenii*, (Tovar et al., 2002) en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR). Se diseñaron nueve dietas (Tabla 1 y 2) con diferente inclusión de CPS y levadura (L). (HP100-L0%(D1), HP100-L1%(D2), HP100-L2%(D3), CPS10%-L0%(D4), CPS10%-L1%(D5), CPS10%-L2%(D6), CPS20%-L0%(D7), CPS20%-L1%(D8), CPS20%-L2%(D9)) por lo que se disminuyó la inclusión de harina de pescado en dichos tratamientos. Las nueve dietas fueron iso-proteicas (55%) e iso-lipídicas (13%), logrando una sustitución parcial de proteína derivada de la harina de pescado.

Los ingredientes se homogenizaron en una mezcladora Marca HOBART (modelo 2000) con capacidad de 1kg, se obtuvieron pellets y se colocaron en una estufa de convección a 60°C, por 24 horas hasta tener una humedad de <5%. Terminado la elaboración de las dietas se almacenaron en bolsas de plástico herméticas a una temperatura de -20°C hasta su uso (Figura 2).



Figura 2. Elaboración de dietas. (A) Homogenización de ingredientes (B) secado de pellets (C) almacenado de la dieta.

Tabla1 .Composición de dietas experimentales.

INGREDIENTE	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D9
H. pescado	76.30	75.85	75.50	68.40	67.90	67.40	60.30	59.80	59.40
CPS	0.00	0.00	0.00	9.23	9.23	9.23	18.48	18.48	18.48
Almidón	11.65	10.65	9.65	10.05	8.60	7.65	7.58	6.62	5.67
H. maíz	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Aceite de pescado	1.10	1.20	1.20	1.37	1.97	2.07	2.69	2.80	2.80
Mez. minerales	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mix. Vit.	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamina C	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina E	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Triptófano	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Taurina	0.30	0.40	0.50	0.30	0.40	0.50	0.30	0.40	0.50
Lisina	0.70	0.85	1.00	0.70	0.85	1.00	0.70	0.85	1.00
Metionina	0.30	0.40	0.50	0.30	0.40	0.50	0.30	0.40	0.50
Levadura	0.00	1.00	2.00	0.00	1.00	2.00	0.00	1.00	2.00

Tabla 2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de levadura correspondiente para cada dieta.

DIETAS	UFC
D1	0
D4	0
D7	0
D2	4.8×10^5
D5	5.6×10^5
D8	4.4×10^5
D3	7.2×10^5
D6	7.2×10^5
D9	7.5×10^5

6.2 Distribución de organismos en laboratorio

Los organismos utilizados para este experimento se obtuvieron de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad

Autónoma de Baja California, México. Se realizó una biometría inicial para obtener datos de longitud (cm) y peso (mg) de los organismos en estudio. Los peces fueron transferidos a las instalaciones experimentales las cuales consistían en un sistema de recirculación termo regulado equipado con 24 tanques de fibra de vidrio de 75 L de capacidad. Durante el ensayo, la temperatura se mantuvo a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ para totoaba y el fotoperiodo fue programado a 12:12 h (luz: oscuridad). La concentración promedio de la salinidad fue de 34‰ y el oxígeno mantenido arriba de 6 mg l^{-1} durante todo el experimento.

Previo al comienzo del experimento, los peces fueron aclimatados en las instalaciones y a la dieta control por un periodo de una semana, alimentándose de acuerdo al protocolo de alimentación para larvas de totoaba (Galaviz et al., 2015). Al finalizar la aclimatación durante una semana se mantuvieron con rotífero, un lote de larvas fue seleccionado al azar y asignados a sus respectivos tanques a una densidad de 120 peces/tanque con un peso inicial de 0.0065gr. Cada alimento experimental fue asignado al azar en tres diferentes tanques (triplicados), la alimentación fue a aparente saciedad tres veces al día (09:00, 14:00 y 19:00 h) durante todo el experimento.

Al final del estudio experimental se midieron y se pesaron de manera individual las larvas de *T. macdonaldi* de cada tratamiento para determinar longitud y peso. 30 larvas de cada tratamiento al día después de eclosión DDE 30 y 40 fueron lavadas con agua destilada y congeladas en hielo seco para después ser almacenadas a -70°C hasta su posterior análisis.

6.3 Preparación de extracto enzimático

Para la extracción de enzimas digestivas, el cuerpo entero de las larvas o sistema digestivo fue utilizado, según el tamaño de la larva. Posteriormente las muestras fueron homogenizadas con disolución de HCl-Tris 50 mM + CaCl_2 25 mM a pH 7.5 en una proporción 1:5 (p/v) se utilizó un homogenizador con pistilo. A continuación, los homogenizados fueron centrifugados a $15\ 000 \times g$ por 20 min a 4°C . El sobrenadante (extracto enzimático) fue distribuido en alícuotas de $100 \mu\text{L}$ y almacenadas a -70°C hasta su posterior análisis. La actividad enzimática fue evaluada una semana después de la preparación de los extractos.

6.4 Cuantificación de la proteína soluble

Se utilizó un estándar de albumina sérica bovina (BSA 2 mg mL⁻¹) para determinar la concentración de proteína de acuerdo con el método de Bradford (1976), con algunas modificaciones para llevar la reacción a microplaca (microensayo). En una microplaca de fondo plano se adicionaron en cada pozo 10 µL del extracto enzimático y 200 µL del reactivo Bradford 1X (Bio-rad). La microplaca fue mezclada e incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 595 nm con un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific).

6.5 Cuantificación de la actividad enzimática digestiva

La actividad de tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa de los extractos larvarios se determinó usando como sustrato BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida) 1 mM (Erlanger *et al.*, 1961), SAPNA (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- P- Nitroanilida) 1 mM (DelMar *et al.*, 1979), y L-leucin-P-nitroanilida 1.2 mM (Apple 1974), respectivamente. Para determinar la actividad enzimática los métodos fueron modificados (microensayo). En una microplaca de fondo plano se adicionaron en cada pozo 20 µL del extracto enzimático y 230 µL de la disolución de sustrato. La microplaca fue mezclada e incubada a 37 °C por 30 min. Posteriormente la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 410 nm para tripsina, quimotripsina y 405 nm para leucina en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific).

6.6 Unidades de actividad enzimática

Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de *p*-nitroanilida (pNA) por minuto bajo las condiciones del ensayo. Es importante mencionar que el coeficiente de extinción (CEM) de cada sustrato fue ajustado a las condiciones del ensayo. La actividad fue expresada en mU mL⁻¹, para esto se empleará la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad (IU mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{ABS corregida} \times 0.250 \text{ mL} \times \text{FD}}{\text{CEM} \times \text{Tiempo (min)} \times 0.020 \text{ mL}}$$

Dónde:

ABS corregida = Absorbancia de la muestra – Absorbancia del blanco

FD = factor de dilución

0.250 mL = volumen de total de reacción

0.020 mL = volumen de la muestra

CEM = coeficiente de extinción ajustado a microplaca (quimotripsina: 6.48; tripsina: 6.95; leucina: 7.87).

6.7 Análisis químicos proximales

6.7.2.1 Preparación de las muestras

En este proceso se realizó una trituración de cada una de las nueve dietas formuladas para determinar el contenido químico proximal de las distintas microdietas para este experimento. Los análisis se realizaron por triplicado para cada una de las dietas.

6.7.2.2 Proteínas totales

El contenido de proteína total en las diferentes dietas se calculó por medio del contenido total de nitrógeno por el método de Kjeldahl, aplicando el factor de 6.25. Este proceso consiste en tres etapas

Digestión: Se añadió 0.05g de sulfato cúprico (CuSO_4), 1.5 g de potasio sulfato (K_2SO_4), 0.05g de muestra (microdietas) y 3 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en un matraz microKjedhal. Se realizaron dos estándares con 0.025 g de grenetina. Posteriormente se colocaron en un microdigestor en donde la tonalidad inicia oscura casi negra el cual le falta mucho por digerir, el progreso cambio de café a color vino hasta culminar con una tonalidad azul turquesa indicando una digestión total de la muestra, como se muestra en la Figura 3. El digerido final (sulfato de amonio) se aforo a 25 ml y se reservó para su posterior proceso (destilación).

Destilación: se vertió en un vaso de precipitado (vpp) de 100 ml se le añadió 15 ml de ácido bórico (H_3BO_3 al 3 %) y 5 gotas de indicador Shiro Tashiro. Este vpp se colocó previamente en la base de vidrio del destilador hasta que el tubo tocara el fondo del vaso una vez este proceso se agregó en la cámara del destilador 5 ml de la muestra y 10 ml de hidróxido de sodio (NaOH 40%) se agregó un poco de agua destilada se cerraron las llaves para no perder la muestra y se encendió el destilador. Una vez que la solución es obtenida (anión borato) el vpp se retiró de la base de vidrio se apagó el equipo y se abrieron las válvulas del

destilador para sacar la muestra del cámara así mismo se realizó un enjuague antes de continuar destilando las demás muestras.

Titulación: Se tituló la solución anterior con ácido clorhídrico HCl hasta obtener el gasto de este reactivo. Posteriormente se calculó el contenido de nitrógeno con la siguiente fórmula.

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{SE ((\text{ml problema} - \text{ml de blanco}) \times N \times 0.014 \times 100)}{\text{gr de muestra}}$$

N= Normalidad del ácido de valoración, V= Volumen de ácido consumido, 0.014= miliequivalentes del nitrógeno.

El contenido de proteínas se determinar utilizando el factor proteínico (6.25)

$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.$



Figura 3: Proceso para proteínas totales: (A) reactivos y dieta triturada, (B) matraces microkjeldahl en su proceso de digestión, (C) digerido aforado y envasado a 25 ml y (D) destilador Kjeldahl.

6.7.2.3 Lípidos totales

Preparación de muestras

Para determinación de lípidos totales se empleó el método modificado de Folch et al. (1957). Se utilizaron tubos de ensayo de 15 ml previamente etiquetados colocando 0.1gr de muestra de las dietas a analizar y un estándar con 0.025 gr de Tripalmitin. Se añadieron 200 μ l de agua destilada a cada tubo, se agitaron con ayuda de un Vortex por 30 seg posteriormente se le añadió 6ml de mix Diclorometano Metanol (D.M.M) proporción (2:1) y se volvió a homogenizar por 3 minutos cada uno de los tubos previamente con este Mix. Se dejó reposar por 2 horas para su posterior proceso.



Figura 4: Preparación de muestras: (E) T. ensayo con microdietas y Mix D.M.M (G) para su homogenización (F).

Filtrado y separación de fases

Se realizó un filtrado con ayuda de jeringas y filtros Whatmann No. 4. Como se muestra en la Figura 5, Vertiendo en tubos limpios la solución y se añadió 1.5 ml de cloruro de potasio (KCl 1.7%) dejando reposar aproximadamente por 3 horas hasta obtener una separación de dos fases. Una vez identificadas y separadas las fases se obtuvo la fase inferior vertiendo 2ml de la solución en los viales. Estos se colocaron en un Thermoblock por 30 minutos a una temperatura (60°C) aproximadamente hasta evaporarse el solvente después se colocaron en un desecador para su posterior pesaje de cada uno de ellos.

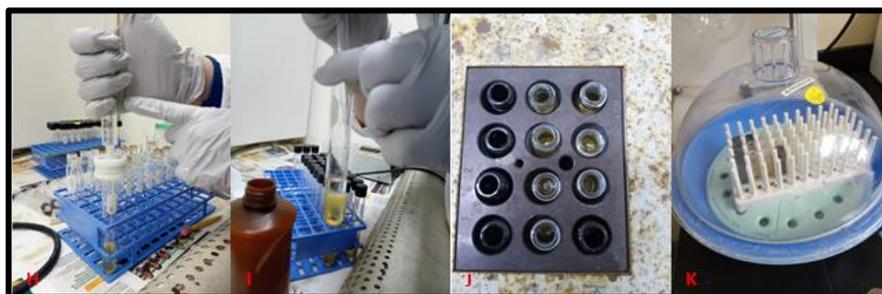


Figura 5: Proceso de filtrado y separación de fases. (H) Filtrado del solvente, (I) Separación de fases, (J) Evaporación de muestras en Thermoblock y (K) muestras evaporadas.

El contenido de lípidos totales se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Lípidos} = (\text{Peso extracto lipídico} / \text{peso de la muestra}) \times 100.$$

6.7.2.4 Humedad y Cenizas

La humedad y cenizas se determinaron de acuerdo a las especificaciones de la AOAC (2000). Se utilizaron capsulas de porcelana (crisoles) y se registró el peso de cada uno de los crisoles. Se colocó 0.25 gr de muestras en cada crisol con sus respectivas dietas. La humedad se estimó por secado en una estufa a 105°C por 6 horas posteriormente se colocaron en un desecador para ir registrando el peso de cada crisol y la ceniza por calcinación en una mufla a 550°C.

El porcentaje de humedad y cenizas se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Humedad} = \frac{100 - (\text{Muestra seca} / \text{Peso muestra inicial}) \times 100}{100}$$

$$\% \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

6.7.2.5 Almidón

El almidón se analizó en las dietas experimentales por medio del método de Thivend et al. (1972), sometiendo 0.05 g de muestra y 25 ml agua destilada a alta presión y temperatura, en un esterilizador MARKET FORGE (STME-E). Posterior a la digestión enzimática con Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (SIGMA-ALDRICH) durante 2 horas, se determinó el contenido de glucosa de la muestra, siguiendo las especificaciones del kit de glucosa (Liquid Glucose Oxidase, POINTE SCIENTEFIC) y leyendo con absorbancia a 500 nm en un Multiskan GO, Thermo Scientific.

6.8 Análisis de Aminoácidos (AAs)

Se tomaron 100 mg de las muestras previamente desgrasadas y secas. Estas fueron hidrolizadas hasta AAs con 5 ml de una mezcla de HCl 6N con 0.06% de fenol en viales de vidrio de 25 mL. La hidrólisis se llevó acabo incubando cada una de las muestras por 24 hrs a 110 °C. Después del tiempo de hidrólisis, las muestras se llevaron a un volumen final de 100 ml, posteriormente fueron filtradas con acrodiscos de 0.45 µm (P.N. 4426T) y colocando un volumen final de 1.5 ml en un vial previamente limpio, calcinado. La derivatización se realizó directamente en el HPLC Agilent (Mod. 1200 infinity series). De manera general, se tomaron 2.5µl del buffer de fosfatos (Part Num. 5061-3339), seguido de 0.5µl de muestra con relación 1:1:1 de OPA:FMOC (Ortoftaldehido: Fluorenylmethyloxycarbonyl), posteriormente fueron inyectadas en secuencia en el HPLC. Para la separación de los AAS se utilizó una columna C18 de fase reversa Zorbax eclipse AAA (4.5 X 150 mm 3.5µm, P.N.

963400-902), donde se empleó un volumen de inyección de 5 μ L. Para la corrida, se utilizó un gradiente de buffer de fosfato de sodio al 40mM (Sigma aldrich, cat num. 71500-250g) y una mezcla de acetonitrilo al 45% Metanol 45% y agua grado HPLC 10%, a un flujo de 1mL/min. El sistema está acoplado a un detector de fluorescencia (1260 FLD series, Agilent technologies, USA) y un detector de DAD (1260 DAD-UV, Agilent technologies, USA), mismos que están configurados en dos longitudes de onda, 340/450 nm y 266/305 nm excitación/emisión y para el DAD, 380nm (OPA) y 262nm (FMOC). La curva de calibración se realizó utilizando una solución de AAs estándares (P.N. 061-3330) con concentraciones de 50 a 350 pmol. Y como último, estimó el área bajo la curva con el programa "OpenLAB" (Agilent Technologies 2000 copyright).

7. Análisis estadístico

La actividad específica e individual de las enzimas digestivas en larvas, así como distintos indicadores biológicos fueron expresados como media y desviación estándar (media \pm D. E). Todos los datos fueron analizados para su normalidad (Kolmogorov) y homocedásticos (Levene). Se realizaron pruebas de análisis de varianzas de dos vías (ANOVA), identificando las diferencias con pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICA Six Sigma. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

8. Resultados

8.1 Análisis químico proximal

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis químico proximal de las dietas elaboradas para el destete de larvas de *T. macdonaldi* se puede observar en la Tabla 3 el contenido proteico de las dietas experimentales que fue alrededor del $56.11 \pm 0.96\%$. Así mismo, las dietas fueron elaboradas con un nivel de lípidos de $13.76 \pm 0.36 \%$, almidón del $7.2 \pm 0.31 \%$, cenizas 11.85 ± 0.91 , humedad $6.28 \pm 0.25 \%$ y ELN del 4.76 ± 1.56 .

Tabla 3. Análisis químicos proximales de las dietas experimentales.

	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9
PROTEINAS	55.52	56.58	56.35	54.63	55.42	57.47	55.21	56.76	57.08
LIPIDOS	13.21	14.29	14.15	13.64	13.90	14.06	13.51	13.43	13.67
ALMIDON	7.58	7.57	7.28	6.82	6.65	7.25	7.36	7.36	7.15
CENIZAS	12.88	12.88	12.79	11.89	11.68	12.11	10.98	11.18	10.31
HUMEDAD	6.39	6.30	5.98	6.29	6.74	6.04	6.37	6.48	5.97
ELN	4.43	2.38	3.44	6.74	5.60	3.08	6.58	4.78	5.83

8.2 Perfil de aminoácidos de microdietas

En el presente estudio, se determinó el perfil de aminoácidos de cada una de las dietas, los cuales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición total de aminoácidos de las dietas experimentales (mg g⁻¹ de materia seca).

Aminoácidos	DIETAS EXPERIMENTALES								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
<i>Aminoácidos esenciales</i>									
HIS	0.9	1.0	1.0	1.2	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0
ARG	5.4	5.4	5.6	5.0	5.3	5.6	5.4	5.3	5.8
THR	2.6	2.7	2.6	2.3	2.6	2.6	2.5	2.6	2.5
VAL	2.6	2.7	2.6	2.5	2.6	2.7	2.6	2.7	2.6
MET	2.6	2.6	2.6	2.3	2.4	2.5	2.5	2.4	2.5
LYS	1.7	1.7	1.8	4.0	2.0	2.3	2.0	2.2	2.2
ILE	2.2	2.3	2.2	2.2	2.3	2.3	2.2	2.3	2.2
LEU	4.4	4.5	4.4	4.4	4.5	4.7	4.5	4.5	4.5
PHE	2.4	2.4	2.4	2.4	2.5	2.6	2.5	2.6	2.5
subtotal	25.0	25.3	25.3	26.3	25.0	26.4	25.2	25.6	25.8
<i>Aminoácidos no esenciales</i>									
ASP	3.8	4.0	3.8	3.7	4.0	3.9	3.8	4.3	3.8
SER	3.3	3.3	3.3	3.2	3.3	3.4	3.4	3.4	3.5
GLU	8.9	9.1	8.8	8.7	9.2	9.2	9.1	9.8	9.1
GLY	6.8	7.0	7.3	5.8	6.4	6.8	6.3	6.1	7.1
ALA	4.6	4.7	4.6	4.0	4.4	4.5	4.2	4.3	4.4
PRO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CYS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TYR	2.1	2.1	2.0	1.9	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
subtotal	29.4	30.1	29.9	27.2	29.2	29.8	28.7	29.8	29.9
<i>otros</i>									
TAU	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4
Total	55.5	56.6	56.4	54.6	55.4	57.5	55.2	56.8	57.1

8.3 Parámetros de crecimiento determinados para el destete de larvas de *T. macdonaldi* a base de microdietas elaboradas a base de CPS y Levadura.

Los índices biológicos del presente estudio se muestran en la Tabla 5. Diferencias significativas fueron observada tanto por el nivel de CPS ($P < 0.01$), nivel de levadura ($P < 0.01$) y la interacción de ambos factores ($P < 0.01$) entre las dietas experimentales en PF, GP, PGP, LF, GL y TCE. Así mismo, diferencias significativas fueron observadas en el % SP debido al nivel de % de levadura en la dieta ($P < 0.05$) pero no por el factor CPS ($P > 0.05$) ni por la interacción de estos dos factores ($P > 0.05$).

Tabla 5. Valores promedio (\pm desviación estándar) de los parámetros de crecimiento e índices productivos de larvas de *Totoaba macdonaldi* para evaluar el uso de levadura como coadyuvante en el aprovechamiento del CPS en dietas con diferentes porcentajes de levadura y CPS.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	ANOVA DE DOS VIAS		
										CPS	X	L
PF	0.24 \pm 0.1 ^{B,b}	0.25 \pm 0.00 ^{B,b}	0.35 \pm 0.01 ^{B,a}	0.28 \pm 0.00 ^{A,b}	0.29 \pm 0.02 ^{A,b}	0.34 \pm 0.02 ^{A,a}	0.30 \pm 0.02 ^{A,b}	0.34 \pm 0.03 ^{A,b}	0.34 \pm 0.03 ^{A,a}	<0.01	<0.01	<0.01
GP	0.23 \pm 0.01	0.25 \pm 0.00	0.34 \pm 0.01	0.28 \pm 0.00	0.29 \pm 0.02	0.33 \pm 0.02	0.29 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03	<0.01	<0.01	<0.01
PGP (%)	3723.71 \pm 182.67	3989.93 \pm 22.25	5452.28 \pm 185.74	4478.11 \pm 138.29	4612.87 \pm 335.27	5308.13 \pm 314.78	4659.58 \pm 326.38	5313.03 \pm 487.95	5346.97 \pm 468.41	<0.01	<0.01	<0.01
LF	29 \pm 0.07	30 \pm 0.14	33 \pm 0.36	33 \pm 1.45	32 \pm 0.74	34 \pm 1.53	32 \pm 1.12	33 \pm 0.78	34 \pm 0.24	<0.01	<0.05	<0.01
GL	21 \pm 0	22 \pm 0	25 \pm 0.57	25 \pm 1	24 \pm 1	25 \pm 1.52	24 \pm 1	25 \pm 0.57	26 \pm 0	<0.01	<0.01	<0.01
SP (%)	69.39 \pm 9.05 ^b	79.74 \pm 19.39 ^a	74.56 \pm 25.43 ^{a,b}	36.78 \pm 6.35 ^b	88.21 \pm 9.05 ^a	73.85 \pm 22.76 ^{a,b}	55.45 \pm 18.93 ^b	59.19 \pm 6.47 ^a	51.72 \pm 13.87 ^{a,b}	>0.05	>0.05	<0.05
TCE (%)	16.43 \pm 0.22 ^{B,c}	16.75 \pm 0.02 ^{B,b}	18.17 \pm 0.15 ^{B,a}	17.27 \pm 0.14 ^{A,c}	17.40 \pm 0.33 ^{A,b}	18.04 \pm 0.26 ^{A,a}	17.45 \pm 0.32 ^{A,c}	18.04 \pm 0.41 ^{A,b}	18.07 \pm 0.39 ^{A,a}	<0.01	<0.01	<0.01

Nota: Las diferencias entre los grupos (DIETAS) en GP, PGP, LF, GL, tuvieron los mismos índices (B, b., B, a., A, b., A, a). Los valores P en rojo muestran diferencias significativas y en negro no se encontraron diferencias significativas. Índices biológicos: Peso promedio final (PF), Ganancia en peso (GP), Porcentaje de ganancia en peso (PGP %), Longitud final (LF), Ganancia en milímetros (GL), Supervivencia (SP %) y Tasa decrecimiento específico (TCE %)

Los mejores pesos finales (PF) fueron observados en las dietas que contenían 10 y 20 % de CPS D9 (0.34 ± 0.03), presentando diferencias significativas ($P<0.01$) con respecto a D1 (0.24 ± 0.1) que contenían HP100 y sin importar el nivel de levadura. Con respecto al factor levadura los mejores PF fueron observados en las dietas D3 (0.35 ± 0.01) que contenían 2 % de levadura con respecto al resto de las dietas.

La mayor ganancia en peso GP se presentó en las dietas D9 (0.33 ± 0.03) que contenían 10 y 20 % de CPS, presentando diferencias significativas ($P<0.01$) con respecto a D1 (0.23 ± 0.01). Respecto al factor levadura la mayor GP se presentó en las dietas D3 (0.34 ± 0.01) que contenían 2 % de levadura con respecto al resto de las dietas.

El porcentaje de ganancia en peso PGP % presentó mejores resultados en los organismos que se alimentaron con las dietas D9 ($5,346.97\pm 468.41$ %) que contenían 10 y 20 % de CPS, respectivamente, presentando diferencias significativas ($P<0.05$) con respecto a D1 ($3,723.71\pm 182.67$ %) que contenían HP100 y sin importar el nivel de levadura. Con respecto al factor levadura los mayores PGP se observaron en las dietas D9 ($5,346.97\pm 468.41$ %) que contenían 2% de levadura con respecto al resto de las dietas que contenían 1 y 0 % de levadura.

Los mejores crecimientos en longitud final (LF) fueron observados también en las dietas que contenían 10 y 20 % CPS D9 (34 ± 0.24) presentando diferencias significativas ($P<0.01$) con respecto a D1 (29 ± 0.07) que contenían HP100 y sin importar el nivel de levadura. Respecto al factor levadura los mejores crecimientos en LF se observaron en las dietas D9 (34 ± 0.24), mientras que los menores crecimientos se presentaron en las D1 (29 ± 0.07) que contenían 0 y 1 % de levadura en las dietas.

Las mejores ganancias en milímetros (GL) fueron observados en las dietas que contenían 10 y 20 % de CPS D9 (26 ± 0) presentando diferencias significativas ($P<0.01$) con respecto a D1 (21 ± 0) que contenían HP100 y sin importar el nivel de levadura. Con respecto al factor levadura las mejores GL se observaron en las dietas D9 (26 ± 0) que contenían 2 % de levadura con respecto al resto de las dietas que contenían 0 y 1 % de levadura D1 (21 ± 0).

Para la supervivencia (SP %) no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en las dietas con 10 y 20 % de CPS, pero si para el factor levadura ($P<0.05$) en donde los mayores SP % se observaron en las dietas que contenían 1 y 2 % D5 (88.21 ± 9.05) de levadura presentando diferencias significativas ($P<0.05$) con respecto a las dietas D4 (36.78 ± 6.35) que contenían 0 % de levadura.

Los mejores rendimientos (TCE %) fueron observados en las dietas que contenían 10 y 20 % de CPS D9 (18.07 ± 0.39) presentando diferencias significativas ($P<0.05$) con respecto a D1 (16.43 ± 0.22) que contenían HP 100 % y sin importar el nivel de levadura. Con respecto al factor levadura los mejores rendimientos se observaron en las dietas D3 (18.17 ± 0.15) que contenían 2 % de levadura con respecto al resto de las dietas D1 (16.43 ± 0.22).

8.4 Determinación de actividad enzimática para larvas de totoaba

Los niveles de actividad enzimática Quimotripsina para el día 30 DDE que se muestran en la Tabla 6 no mostraron diferencias significativas ni por el factor CPS y levadura ni por la interacción de ambos ($P>0.05$). Sin embargo, la actividad tipo tripsina mostro diferencias significativas ($P<0.05$) por el factor levadura, pero no con CPS y la interacción de ambos. En donde la actividad más alta fue observada en las dietas D4 (0.39 ± 0.06) presentando diferencias significativas con respecto a D3 (0.19 ± 0.00) que contenían 2 % de levadura. La actividad enzimática LA fue influenciada solo por la interacción de estos dos factores ($P<0.01$) como se observa en la Tabla 6.

Para el día 40 DDE la actividad enzimática Quimotripsina como se observa en la Tabla 7 presentó diferencias significativas tanto por el CPS y la interacción de ambos ($P<0.05$) pero no por la levadura ($P>0.05$) en donde la actividad más alta fue observada en las dietas con 10 y 20 % de CPS D8 (3.03 ± 0.87) presentando diferencias significativas ($P<0.05$) con respecto a las dietas que contenían 0 % de CPS D2 (0.80 ± 0.36). Para Tripsina no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) ni por el factor CPS, levadura y la interacción de ambos.

Sin embargo, para la actividad enzimática tipo LA se observaron diferencias significativas por parte del factor CPS y la interacción de ambos, pero no por la levadura (>0.05). En donde

la actividad enzimática más alta fue observada en la dieta D8 (9.55 ± 3.24) que contenían el 20 % de CPS presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a las dietas que contenían 0 y 10 % CPS mostrando los niveles más bajos de LA D4 (1.46 ± 1.08).

Tabla 6. Valores promedios (\pm desviación estándar) de la actividad enzimática digestiva al día 30 DDE en larvas de *Totoaba macdonaldi* para evaluar el uso de levadura como coadyuvante en el aprovechamiento del CPS en dietas con diferentes porcentajes de levadura y CPS.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	ANOVA DOS VIAS		
										CPS	X	L
Quimotripsina	0.76 \pm 0.08	0.54 \pm 0.01	0.50 \pm 0.13	0.73 \pm 0.13	0.75 \pm 0.07	0.83 \pm 0.22	0.66 \pm 0.20	0.74 \pm 0.03	0.71 \pm 0.23	>0.05	>0.05	>0.05
Tripsina	0.30 \pm 0.14 ^a	0.21 \pm 0.03 ^{a, b}	0.19 \pm 0.00 ^b	0.39 \pm 0.06 ^a	0.22 \pm 0.05 ^{a, b}	0.21 \pm 0.02 ^b	0.23 \pm 0.09 ^a	0.29 \pm 0.02 ^{a, b}	0.20 \pm 0.01 ^b	>0.05	>0.05	<0.05
LA	0.79 \pm 0.24	0.43 \pm 0.07	0.30 \pm 0.04	0.47 \pm 0.12	0.44 \pm 0.11	0.57 \pm 0.20	0.36 \pm 0.12	0.49 \pm 0.11	0.34 \pm 0.06	>0.05	<0.01	>0.05

Nota: Actividad enzimática (mU mg de proteína⁻¹) Quimotripsina, Tripsina y Leucina aminopeptidasa (LA). Los valores de P que se muestran en negro no presentaron diferencias significativas entre los grupos. Día Después de eclosión (DDE).

Tabla 7. Valores promedios (\pm desviación estándar) de la actividad enzimática digestiva al día 40 DDE en larvas de *Totoaba macdonaldi* para evaluar el uso de levadura como coadyuvante en el aprovechamiento del CPS en dietas con diferentes porcentajes de levadura y CPS.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	ANOVA DOS VIAS		
										CPS	X	L
Quimotripsina	1.65 \pm 0.53 ^B	0.80 \pm 0.36 ^B	2.85 \pm 0.65 ^B	2.86 \pm 1.25 ^{A, B}	2 \pm 0.48 ^{A, B}	1.64 \pm 0.61 ^{A, B}	2.41 \pm 0.24 ^A	3.03 \pm 0.87 ^A	2.41 \pm 0.28 ^A	<0.05	<0.01	>0.05
Tripsina	3.26 \pm 1.46	3.21 \pm 1.11	4.74 \pm 2.9	2.37 \pm 0.96	4.30 \pm 0.00	2.64 \pm 0.29	4.66 \pm 0.32	3.59 \pm 0.78	3.54 \pm 1.26	>0.05	>0.05	>0.05
LA	2.82 \pm 0.87 ^B	2.59 \pm 0.59 ^B	4.21 \pm 2.79 ^B	1.46 \pm 1.08 ^B	3.85 \pm 1.20 ^B	6.46 \pm 2.32 ^B	6.53 \pm 0.15 ^A	9.55 \pm 3.24 ^A	5.05 \pm 1.65 ^A	<0.01	<0.05	>0.05

Nota: Quimotripsina, Tripsina y Leucina aminopeptidasa (LA). Los valores de P que se muestran en rojo representan diferencias significativas entre los grupos. Día Después de eclosión (DDE).

9. Discusión

En el cultivo de peces marinos de importancia comercial, la larvicultura es considerada uno de los cuellos de botella, debido a las altas mortalidades que se presentan en dos periodos que son considerados crítico de las diferentes especies de peces marinos en cultivos de laboratorio. (Alarcón et al., 2002; Lazo, 2000). El primer periodo donde ocurre altas mortalidades es al inicio de la alimentación exógena, que es cuando la larva ha consumido en su totalidad el saco vitelino y la gota de aceite; en este periodo la larva debió haber abierto la boca y ano, así como haber desarrollado los órganos esenciales para la digestión de alimentos, por ejemplo: ojos, esófago, intestino, páncreas, hígado y vejiga natatoria (Govoni et al., 1986). El segundo periodo crítico donde ocurren altas mortalidades es en la deshabituación, mejor conocido como destete, que ocurre cuando la larva podría iniciar la transición de alimento vivo al formulado. En este periodo la larva desarrolla por completo sus órganos que son considerados esenciales e importantes para la primera alimentación exógena, sin embargo, otros cambios importantes que sufren las larvas para completar este periodo, se basa principalmente en el desarrollo y formación de un estómago funcional, es decir, con glándulas gástricas desarrolladas capaces de secretar ácido clorhídrico para que se lleve a cabo la activación de enzimas ácidas como la pepsina. Cuando ocurre este proceso, diversos autores mencionan que es el final de la etapa larvaria y es el inicio del estadio juvenil de los peces (Curnow *et al.* 2006).

Durante la etapa larvaria también es donde se llevan a cabo los mayores costos de producción en un laboratorio de producción de larvas de peces marinos, ya que se debe de contar con personal técnico calificado que pueda asegurar la producción, disponibilidad y calidad del alimento vivo en cada uno de los estadios de desarrollo de la larva y es en este periodo donde el desarrollo de nuevas metodologías y protocolos de alimentación debes de llevarse a cabo (Koven et al., 2001).

El uso de dietas artificiales como las microdietas ha tomado un gran interés en la industria de la larvicultura, debido a que pueden disminuir los costos de producción durante la etapa larvaria, ya que reducirían la producción de alimento vivo y por ende los gastos operativos

del cultivo y se ha demostrado en distintos estudios que el uso adecuado de microdietas se pueden obtener mejores crecimientos y mayores porcentajes de supervivencia (Curnow et al., 2006; Blair et al., 2003; García, 2000; Kolkovsy, 2001; Muguet et al., 2011). Al realizar estos procesos de co-alimentación (alimento vivo-microdieta), la industria acuícola busca reducir costos de producción, sin embargo, la mayoría de las microdietas utilizadas actualmente en el mercado dependen de harina de pescado de alta calidad e ingredientes sumamente caros, lo que ocasiona que el uso de microdietas por periodos largos en la larvicultura aumente los costos de producción, es por ello, que se deben de buscar alternativas de desarrollo de nuevas microdietas que pueda utilizar proteína de origen vegetal y aditivos que se reflejen en buen rendimiento en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de peces sin afectar la salud (Gisbert et al., 2016; Zhan et al., 2019).

En el presente estudio se realizó un protocolo de destete por co-alimentación utilizando a la levadura marina *Debaryomyces hansenii* como suplemento en microdietas elaboradas con concentrado de proteína de soya para el destete de larvas de totoaba. El uso de levaduras como probióticos han demostrado promover el crecimiento, sobrevivencia y ayudan en la expresión genes de las principales enzimas digestivas que juegan un papel importante en la etapa larvaria (Tovar et al., 2008), ya que podrían coadyuvar en el aprovechamiento del CPS en la dieta, debido a que podría promover diversos procesos fisiológicos positivos como la maduración temprana del sistema digestivo favoreciendo los niveles de actividades enzimáticas y con ello crecimientos y supervivencias mayores (Tovar et al., 2004; Guzmán-Villanueva et al., 2007). Los porcentajes de supervivencia del presente estudio mostraron diferencias significativas sin importar los niveles de CPS en las dietas administradas a las larvas en cultivo. Los mejores porcentajes de sobrevivencia fueron observados en los tratamientos que contenían 2% de *D. hansenii*, teniendo una tendencia a incrementar el porcentaje de sobrevivencia conforme aumentaba el nivel de *D. hansenii* en la dieta sin importar el nivel de CPS. Tovar et al. (2002), observaron en larvas de lobina europea (*D. labrax*) que esta especie tiene mejores porcentajes de sobrevivencia cuando es alimentada con dieta que contenía *D. hansenii* en lugar de *S. cerevisiae* y dieta control comercial. Esto puede deberse a que existe una adhesión y colonización de la levadura en

el tracto digestivo de las larvas de totoaba, facilitando la maduración del sistema digestivo, por efecto de la liberación continua de poliaminas. Hecho que deberá ser comprobado en futuras investigaciones pero que ha sido observado en otras especies.

Tovar et al. (2002) también observó el nivel de actividad enzimática tipo tripsina a los días 27 y 42 DDE obteniendo un incremento de manera similar con su dieta control y su dieta a base de levadura, en el caso de las enzimas exopeptidasas mostraron una tendencia progresiva y con ello, la disminución de enzimas citosólicas, indicando así la maduración de la función de los enterocitos. En contexto, el uso de la levadura *D. hansenii* incrementa el grado de interés en la larvicultura de peces gracias a la presencia de distintos factores como la adhesión al mucus intestinal, el grado de adhesión y posterior colonización; además de estimular el sistema inmune, crecimiento, supervivencia y calidad larvaria de peces marinos en comparación con *S. cerevisiae*. Álvarez González (2003), en su estudio con larvas de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) observó mejores crecimientos y mayores porcentajes de sobrevivencia en larvas alimentadas con microdietas a base de harina de hidrolizado proteico en lugar de microdietas a base de harina de sangre y microdieta de harina de calamar. Esta diferencia pudo deberse a que la dieta de calamar contiene proteínas que no han sido predigeridas como las contenidas en la microdieta de hidrolizado proteico, lo cual dificulta el proceso de digestibilidad y, por lo tanto, requieren de mayor gasto energético para ser digeridas en un tracto digestivo que apenas es recién formado y no cuenta con las estructuras del sistema digestivo completamente formadas (Kolkovski y Tandler, 2000). Así mismo, Cahu et al. (1999), observaron que la adición moderada de hidrolizados de proteína en las microdietas para larvas de peces, puede ayudar en la aceleración de la maduración del tracto digestivo de algunas especies de larvas de peces marinos, lo que podría ayudar a incrementar el crecimiento y sobrevivencia debido a que el gasto energético utilizado en los procesos de digestión de la microdieta podría disminuir y utilizar la energía restante para un mejor crecimiento y por resultado, mejor sobrevivencia (Zambonino-Infante et al., 1997). En el presente estudio, la adición de *D. hansenii* en las microdietas contribuyó a que el alimento fuera digerido de una manera más eficaz, ya que se ha demostrado, que el uso de esta levadura estimula la maduración de tracto digestivo

y aumenta la secreción de amilasa, tripsina, y enzimas del borde de cepillo lo cual ayuda a mejorar la digestión de la microdieta, en relación a las larvas alimentadas con microdietas que contenían CPS sin probiótico..

En otro estudio Tovar et al. (2004) llevaron a cabo un experimento para conocer el efecto de dos niveles de *D. hansenii* en la microdieta (1.1 y 5.7%) y una microdieta control sin levadura en larvas de la lubina Europea, *D. labrax* y sus efectos sobre crecimiento, sobrevivencia y desarrollo del sistema digestivo. Observaron que con el 1.1 % se obtienen mejores crecimientos y mejores porcentajes de sobrevivencia en lugar de dietas que contenían el 5.7% de *D. hansenii* y dieta control. Esto concuerda con nuestros resultados en donde porcentajes con 1 % y 2 % de levadura marina se obtuvieron mejores porcentajes de supervivencia, así como el porcentaje de TCE, lo cual llega a revelar el estado en crecimiento en longitud y peso en días. Esto puede atribuirse a que al incluir estas levaduras a las microdietas para larvas de peces marinos, estas aportan moléculas de importancia fisiológica para los organismos como lo son en este caso las poliaminas, siendo consideradas como factores de crecimientos naturales ya que estas moléculas participan como modulares de diversas funciones biológicas, entre ellas, la proliferación y diferenciación celular, estimulación de la replicación del ADN y con ello favorecen la síntesis de proteínas (Ochoa y Vázquez, 2004; Tovar et al., 2004).

De acuerdo a la hipótesis planteada en este trabajo. Se cumple, ya que nuestros resultados muestran mejores supervivencias y crecimientos durante el desarrollo experimental de larvas de totoaba, y con esto se comprueba que el uso levaduras marinas es una buena opción para la maduración temprana del sistema digestivo. Resultados como un porcentaje bajo en supervivencia o crecimiento puede deberse a que este tipo de alimento inerte no cumpla con una buena digestibilidad o la escasa actividad enzimática en los primeros días de vida de las larvas, tiempo en el que aún no están listas para su primer alimento exógeno. Por ello, se hace énfasis en realizar protocolos de destete por co-alimentación (Curnow et al., 2006; Guzmán, 2008; Murray et al., 2010).

Aunado a ello, la actividad enzimática como se menciona anteriormente puede ser una señal que da fina al desarrollo larval y con ello el inicio del periodo juvenil, esto cuando las

larvas dejan de depender de una digestión alcalina y empiezan el proceso de digestión ácida. Es por ello, que el aumento de ciertas enzimas al inicio de la etapa larval, durante la primera alimentación exógena, refleja un alto nivel en enzimas citósolicas (leucina-alanina peptidasa, catepsina, tri y di peptidasa) que con el paso del tiempo estas deben ir disminuyendo y así alcanzar una fase de maduración de la función digestiva de los enterocitos. Progresivamente los niveles de enzimas localizadas en el borde del cepillo deben aumentar (Moguel., 2015). Resultados observados por Péres et al. (1997) encontraron que con altos niveles de espermina las larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alcanzaron la maduración del intestino siendo similar con su dieta control que fue a base de alimento vivo, y relaciona el aumento de la supervivencia por la maduración del intestino que alcanzaron los organismos con este nivel de espermina comparado con los que tenían baja inclusión de espermina. Resultados obtenidos en el presente estudio con larvas de totoaba resaltan que con inclusiones de 20 % de CPS en la microdieta, los niveles de quimotripsina al DDE 30 se ven afectados cuando la microdieta no es suplementada con levadura. Sin embargo, al DDE 40 los niveles de quimotripsina y tripsina incrementaron, conforme el nivel de CPS en las dietas. Presentando diferencias con respecto a las dietas a base de harina de pescado. Sin embargo, al DDE 40 los niveles de actividad de leucina aminopeptidasa presentaron una tendencia a incrementar conforme aumentó el nivel de levadura en la dieta, lo que podría estar indicando la maduración de los enterocitos como lo describen distintos autores (Moguel., 2005; Péres et al., 1997; Tovar et al., 2020), esto puede dar inicio a que en consecuencia los cambios generados por las actividades enzimáticas las cuales realizan funciones diversas como degradación terminal de las proteínas y con esto un indicador el cual se consideran que las larvas han alcanzado el mismo nivel de funcionalidad que en juveniles y adultos

Galaviz et al. (2015) describen actividades enzimáticas tipo proteasas las cuales van en aumento conforme se desarrolla la larva de totoaba, existiendo cambios significativos en ciertas enzimas cuando se dan los traslapes de cambios de alimento (rotífero-*Artemia*-microdieta) observándose mayores niveles de actividades enzimáticas durante los días 36 y 40 DDE. El tracto digestivo en las larvas de peces marinos no está desarrollado al momento

de la eclosión y durante las primeras semanas de desarrollo sufrirá cambios importantes a nivel bioquímico y fisiológico, por lo cual, los procesos digestivos, como el aumento de las actividades enzimáticas, en especial las de tipo alcalina serán importantes durante los primeros días de desarrollo e irán en aumento conforme aumenta el grado de maduración del sistema digestivo (Dabrowski, 1986; Cahu y Zambonino Infante, 1994; Galaviz et al., 2015). En el presente estudio, se observó que al DDE 30 los niveles de actividad de quimotripsina incrementaban conforme aumentaba el nivel de CPS y levadura en la microdieta, mientras que los niveles de tripsina disminuían en el mismo orden, a su vez, los niveles de actividad de leucina aminopeptidasa tenía una tendencia a disminuir conforme aumentaba el CPS y el % de levadura en la microdieta, sin embargo, al día DDE 40, los niveles de actividad enzimática cambiaron, observándose mayores niveles de actividad en leucina aminopeptidasa conforme aumentada el nivel de CPS y % de levadura en la dieta, mientras que los niveles de quimotripsina y tripsina tenían una tendencia inversa a lo observado al DDE 30. El cambio de la digestión citosólica a la digestión membranosa en los enterocitos refleja el cambio de una digestión larvaria a un modo de digestión similar a los adultos de la especie. Este fenómeno es común en todos los vertebrados estudiados y constituye la maduración del intestino en los organismos (Henning, 1985).

10. Conclusiones

- El uso de microdietas de origen proteico vegetal logrará reducir parcialmente la inclusión de harina de pescado en larvas de *Totoaba macdonaldi*.
- El uso de proteína vegetal como lo es el CPS logró ser digestible en dietas para larvas de totoaba, siempre y cuando se use la suplementación de levaduras.
- El uso de microdietas para el destete de larvas de totoaba mediante protocolos de co-alimentación logro mayores rendimientos.
- La presencia de *D. hansenii* logro la maduración temprana del tracto digestivo de larvas de totoaba.
- La inclusión de levadura niveles de 1 y 2 % logró mejorar el crecimientos y supervivencias, además, la maduración temprana del tracto digestivo, mejores niveles de actividad enzimática de larvas de totoaba logrando llegar al mismo nivel de funcionalidad que un juvenil.

11. Literatura citada

- Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz, M., 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *J. Sci. Food Agric.* 82, 697–704. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1100>
- Álvarez González, C.A., 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serraniadae). Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas Thesis, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas., La Paz, B.C.S., México, xii, 164 pp. Disponible en línea: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/15177>
- AOAC,2000. Official Methods of Analysis of AOAC. international; agricultural chemicals, contaminants, drugs.17ª Edition. Maryland. E.E.U.U.
- Apple, W. 1974. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Leucine Aminopeptidase Determination with L-Leucineamide as Substrate in Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp. 954–958.
- Apún Molina, J.P.,2007. Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linneaus, 1758), cultivada en el laboratorio. De centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa – Instituto Politécnico Nacional, en Guasave, Sinaloa - México. Disponible en línea: <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx:80/jspui/handle/123456789/214>
- Barboza Huamán, C.A., 2016. Determinación de la digestibilidad de nutrientes y la energía digestible de la torta de soya (*Glycyne max*) en juveniles de Gamitana (*Colossoma macropomum*). Tesis de Ingeniería. Universidad Nacional Agraria la Molina. Facultad de Zootecnia, Departamento académico de nutrición. Lima, Peru.88pp. Disponible en línea: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2652/M12-B37-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D´Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P., Ogunmoye, K., 2003.Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*; 225(1-4): 451-461. Disponible en línea: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00309-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00309-0)
- Bradford, M. M.,1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213-222. Disponible en línea: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90123-6)
- Cárdenas de la Cruz, A.G., (2015). Mejoramiento de la etapa de prensado en el proceso de elaboración de harina de pescado mediante un sistema automatizado de control de la humedad en la empresa jada s.a. – Chimbote. Tesis de ingeniería. Universidad Nacional de Trujillo, facultad de ingeniería. Trujillo, Peru.109pp. Disponible en línea:

<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/2714>

- Carrillo Longoria J. A., D. Sánchez Ávila, L. H. Hernández, O. Ángeles López y M. A. Fernández Araiza., 2018. Reemplazo de harina de pescado con gluten de maíz en dietas de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): efectos en crecimiento y otros parámetros fisiológicos. *Hidrobiológica* 28 (3): 257-263. Disponible en línea: <https://www.doi.org/10.24275/uam/izt/dcbh/hidro/2018v28n3/Hernandez>
- Chu, F.E., Ozkizilcik, S., 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 237, 1–9. Disponible en línea: [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00216-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00216-0)
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J., Kolkovski, S. The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture*, 257(1-4), 204-213. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.073>
- Dabrowski, K.R. 1986. Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 85, 639-655. Disponible en línea: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90272-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90272-0)
- DelMar EG, Largman C, Brodrick JW, Geokas MC., 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 1; 99(2):316-20.
- Erlanger., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), 271–278.
- Escuredo Vielba, R., 2018. Identificación y caracterización de las células germinales primordiales (CGPs) en embriones y larvas de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 102pp. Disponible en línea: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2535>
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. Disponible en línea: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957 A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fuentes Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso, A.N., Guerrero-Rentería, 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. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.025>
- Galaviz M., L. López, A. García y C. True. Expression and activity of three digestive proteases in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae during development. En: Cruz-Suárez L.E., D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Nieto-López, D. Villareal-Cavazos y J. Gamboa-Delgado (Eds.). *Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 08-10 Noviembre*. San Nicolas de los Garza, Nuevo León. México
- García-Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de

proteína en dietas artificiales para larvas de peces In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22. Mérida, Yucatán. Disponible en línea: https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/agarcia.pdf

García-Ortega, A., Muy-Rangel, D., Puello-Cruz, A., Villa-López, Y., Escalante-Rojas, M., Preciado-Iñiguez, K. 2010. Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 321-340. Disponible en línea: https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/X/archivos/13-ArmandoGarcia.pdf

Gatesoupe, F. J., 2000. Uso de probióticos en acuicultura. pp 463-472 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. Disponible en línea: https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/27gates.pdf

Govoni, J.J., G.W. Boehlert y Y.L. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Environ. Biol. Fishes 16, 59-77. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1007/BF00005160>

Guzmán Villanueva, L., Tovar-Ramírez, D. and Civera Cerecedo, R. 2007. Effect of wild and ornithine decarboxylase deficient *Debaryomyces hansenii*, on *Paralabrax maculatofasciatus* larvae development, Caribbean and Latin American Aquaculture 2007, San Juan Puerto Rico, 6 - 9 Noviembre.

Guzmán, V.L.T., 2008. Efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii* silvestre e inhibida de su actividad ORNITIN-DESCAROXILASA sobre el desarrollo larvario de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Tesis de maestría. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.116pp. Disponible en línea: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/206>

Henning, S. J. (1985). Ontogeny of enzymes in the small intestine. Annual Review of Physiology 47, 231–245. Disponible en línea: 10.1146/annurev.ph.47.030185.001311

Kolkovski, S. 2008. Advances in marine fish larvae diets. 20-45 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. Disponible en línea : https://www.researchgate.net/publication/228511731_Advances_in_Marine_Fish_Larvae_Diets

- Kolkovski, S. y A. Tandler. 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquacult. Nutr.* 6, 11-15. Disponible en línea: [10.1046/j.1365-2095.2000.00125.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00125.x)
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194,107–121. Disponible en línea: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00501-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00501-9)
- Lazo, J.P., 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 19-22 Noviembre, Mérida. Yucatán, México.* Disponible en línea: https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/lazo.pdf
- Linares Aranda, M., 2007. Efectos de la incorporación de levaduras vivas en el alimento sobre la capacidad digestiva en juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosácea* (Streets,1877). Tesis de maestría, programa de posgrado de CIBNOR. Disponible en línea: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/167>
- Loarte, D.C., Luna, P.Y., 2017. Sustitución parcial de harina de pescado por harina de hoja de yuca (*Manihot esculenta*) como insumo en la dieta, en el crecimiento y supervivencia de *Colossoma macropomum* "gamitana" en laboratorio. Tesis de para obtener el grado de biólogo acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Facultad de Ciencias. Nuevo Chimbote, Peru. 54pp. Disponible en línea: <http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/3161>
- López, L. M., A. Galaviz, M., Flores Ibarra, M., Bañuelos Vargas, I., Budi Satriyo, T., Peres, H., Pérez Jiménez, A., Salze, G., & D. True, C. (2015). Importancia nutricional de taurina en peces carnívoros como *Totoaba macdonaldi*, cuando es alimentada con dietas ricas en proteína vegetal. *Avances en nutrición acuícola.* Disponible en línea: <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/51>
- Madrid Hernández, J., 2019. Estimación del perfil de aminoácidos óptimo para el mayor crecimiento y eficiencia alimenticia en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 119pp. Disponible en línea: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2777>
- Mata, S.J.A., 2010. Evaluación del éxito en el destete en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y jurel cola amarilla (*Seriola lalandi dorsalis*) utilizando el crecimiento, supervivencia y/o tasas de ingestión. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. 92pp. Disponible en línea: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/106>
- Minjarez Osorio, C., Castillo-Alvarado, S., Gatlin, D.M., González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M., Waldemar, R.Jr., 2016. Plant protein sources in the diets of the sciaenids red drum (*Sciaenops ocellatus*) and shortfin corvina (*Cynoscion parvipinnis*): A comparative study. *Aquaculture*, 453,122-129. Disponible en línea:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.042>

- Moguel, H.I., 2015. Fisiología digestiva durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur .123pp. Disponible en línea: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/21732/1/moguelhe2.pdf>
- Morales, O.C., 1999. Descripción del desarrollo embrionario de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura. Universidad autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California.56pp.
- Moyano, F.J.,Barros, A,M., Prieto, A., Cañavate, J.P.,Cardenas, S.2005. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de Hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). Revista AquaTIC n°22, pp.39-47. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/28080838>
- Muguet, J.B., Lazo, J.P., Conklin, D.E., Piedrahita, R.H., 2011. Evaluation of weaning performance of California halibut (*Paralichthys californicus*) larvae using growth, survival and digestive proteolytic activity. Aquac. Nutr. 17, 486–493. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00786.x>
- Murashita, K., Fucada, H., Ronnestad, I., Kurokawa, T., Masumoto, T.,2008. Nutrient control of release of pancreatic enzymes in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Involvement of CCK and PY in the regulatory loop. Comp.Biochem. Physiol.A150,438-443. Disponible en línea: 10.1016/j.cbpa.2008.05.003
- Murray, H. M., Lall, S. P., Rajaselvam, R., Boutilier, L. A., Flight, R. M., Blanchard, B., Colombo, S., Mohindra, V., Yufera, M., Douglas, S. E.2010. Effect of early introduction of microencapsulated diet to larval atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. assessed by microarray analysis.Marine Biotechnology, 12, 2, pp.214-229. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9211-4>
- Ochoa, J., & Vázquez Juárez, R.,2004. Las levaduras marinas como herramienta científica y biotecnológica. Universidad y Ciencia, Núm. Esp. (I), 39-50. Disponible en línea: <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/854>
- Péres, A., Cahu, C. & Zambonino Infante, J.,1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiology and Biochemistry 16, 479–485. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1023/A:1007786128254>
- Piñeros-Roldan, A.J., Gutiérrez-Espinoza, M.C., Castro-Guerrero, S.R.,2014. Sustitución total de la harina de pescado por subproductos avícolas suplementados con aminoácidos en dietas para juveniles de *Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818.Revista ORINOQUIA-Universidad de los Llanos – Villavicencio, Meta, Colombia.Vol.18-No 2, pp. 13-24. Disponible en línea: <https://doi.org/10.22579/20112629.298>
- Reyes Beceril, M., D., Tovar-Ramirez, F.Ascencio-Valle, R.Civera-Cerecedo, V.Garcia-Lopez y V.Barbosa-Solomieu.,2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the

immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*. 208 ,39-44. Disponible en línea: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.056

Reyes, M.C.,2008. Efecto de la Levadura Marina *Debaryomyces hansenii* en la dieta sobre la respuesta inmune de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosácea* y Dorada Sparus *aurata*. Tesis Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur.132pp.

Sanz, F.,2009. La nutrición y alimentación en piscicultura. Editorial paraninfo. Madrid, España. Vol I 803 pp.

Thivend P, Mercier C, Guilbot A.,1972. Determination of starch with glucoamylase. *Methods Carbohydr Chem* 6:100–105. Disponible en línea: 10.1016/B978-0-12-746206-6.50021-7

Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe and R. Vázquez-Juárez., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, vol: 234/1-4, pp 415-427. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028>

Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and R. Lésel.,2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, vol 204/1-2,pp113-123.disponible en línea: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00650-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00650-0)

Tovar, D., Reyes, M.C., Guzmán, L., Gleaves, V., Civera, R., Ascencio, F., Garcia, V., Barbosa, V., Gisbert, E., Andre, K.B., Alvarez, C.A., Moyano, F.J., Ortíz, J.L, Hinojosa, P., Gutierrez, J.N., Millán, A.A., Linares.,2008. Probióticos en Acuicultura: Avances Recientes del Uso de Levaduras en Peces Marinos.237-257pp. Disponible en línea: https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IX/archivos/12-Tovar.pdf

Trejo Ramos, D.A. 2019. Histología sistémica de larvas y juveniles de Totoaba macdonaldi y su respuesta ante un evento de vibriosis. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 101 pp. Disponible en línea: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2813>

True, C.,2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California. 24 pp.

Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30; 404-27. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>

Zambonino Infante, J.L., & Cahu, C.L .2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation.*Acuaculture* 268,98-105.disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.032>

- Zambonino-Infante, J.L., C.L. Cahu y A. Peres. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127, 608-614. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1093/jn/127.4.608>
- Zhang J., Zhong L., Peng M., Chu W., Liu Z., Dai Z., Hu Y., 2019. Replacement of fish meal with soy protein concentrate in diet of juvenile rice field eel *Monopterus albus*. *Aquaculture Reports*, Volume 15, 100235, ISSN 2352-5134. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100235>
- Zhu, R., Li, L., Li, M., Yu, Z., Wang, H., Wu, L. 2020. The effects of substituting fish meal with soy protein concentrate on growth performance, antioxidant capacity and intestinal histology in juvenile golden crucian carp, *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*. *Aquaculture* 100435. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100435>