

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“Determinación del grado de hidrólisis, digestión *In Vitro* y aminoácidos libres de distintas fuentes proteicas de subproductos terrestres; utilizando extractos enzimáticos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*)”

TESIS

PARA CURBIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

Octavio Vázquez Aparicio

Ensenada, Baja California, México, enero 2025



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
CAMPUS ENSENADA**



“Determinación del grado de hidrólisis, digestión *In Vitro* y aminoácidos libres de distintas fuentes proteicas de subproductos terrestres; utilizando extractos enzimáticos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*)”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

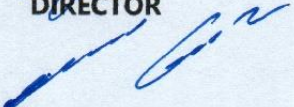
**PRESENTA:**

**Octavio Vázquez Aparicio  
353668**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

  
Dr. Fernando Barreto Curiel  
**DIRECTOR**

  
Dra. Lus Mercedes Lopez Acuña  
**SINODAL**

  
Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza  
**SINODAL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE  
CIENCIAS MARINAS

**“Por la Realización Plena del Ser”**

C.c.p.- Archivo  
C.c.p.- Minutario

# Dedicatoria

A mi madre, mi padre y mi hermano por haberme acompañado y alentado durante esta larga odisea, porque sin su amor, apoyo y comprensión este trabajo no hubiera podido ser realizado.

A los amigos que estuvieron conmigo desde el inicio de este viaje, pero también a aquellos que se sumaron a medio camino o al final, sin ellos esta travesía se hubiera sentido muy vacía y el ánimo no hubiera sido el mismo.

A mis artistas favoritos que me permitían refrescar mis ideas, inspirarme y sobre todo concentrarme, porque sin su música no hubiera sido posible dedicar tantas horas de trabajo y esfuerzo.

A mí mismo, porque a pesar de las dificultades y contratiempos no desistí y me propuse a terminar este trabajo.

*Porque los sueños y metas se cumplen, pero también cambian.*

# Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California y la Facultad de Ciencias Marinas, las instituciones que me recibieron, me dieron una formación integral en sus laboratorios y me hicieron sentir orgulloso de ser parte de ellas, fueron mi segundo hogar en una de las mejores etapas de mi vida.

A mi director de tesis, Dr. Fernando Barreto, por creer y confiar en mi esfuerzo y capacidad no solo desde el inicio de este trabajo, sino desde mucho antes, y por respetar mis tiempos y brindarme más siempre que era necesario.

A mi comité de tesis, Dra. Lus Mercedes López y Dr. Mario Alberto Galaviz, quienes me guiaron y orientaron desde la parte experimental hasta la redacción y organización de ideas de este trabajo, así como también al Laboratorio de Nutrición Acuícola por permitirme ser parte de su gran equipo.

Agradecimiento al proyecto “ESTUDIO DEL APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA Y ACUACULTURA PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS Y COMO FUENTE ALTERNATIVA DE PROTEÍNA PARA ALIMENTOS ACUÍCOLAS” de la 23 Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación UABC, programa 395 por el financiamiento y la beca otorgada para la realización de la presente tesis.

Al Dr. Emyr Peña, porque fue junto con él que pude trabajar con el pH STAT y sin su invaluable ayuda, comentarios y sugerencias no hubiera sido posible trabajar por semanas o meses en la experimentación que involucró ese equipo.

A Samantha, la técnica del Laboratorio de Nutrición Acuícola, quien me acompañó y ayudó desde el inicio hasta el final de la carrera, sorteando toda clase de aventuras y situaciones, y porque nunca me negó una taza de café o unas galletas.

Al profesor Raúl Herrera, por su infinita paciencia y por ser quién me ayudó a empezar mi travesía a través de aguas misteriosas, gracias a su ayuda pude empezar a atar cabos y tejer mi red de trabajo dentro y fuera de sus clases.

A los profesores que durante la carrera siempre me motivaron a seguir aprendiendo, a los que hicieron que disfrutara las clases y la carrera, a los que fueron maestros dentro y fuera del salón de clases y a los que me alentaban a seguir.

A todo el equipo que conforma Baja Trout, ya que junto con ellos no solo he aprendido más de lo que hubiera imaginado, sino que además me ofrecieron una oportunidad única y porque juntos hemos superado innumerables obstáculos, aventuras y desventuras. Gracias por su apoyo, confianza, amistad, ánimo, esfuerzo y perseverancia.

A mi familia, quienes fueron mi principal red de apoyo desde el inicio hasta el final de esta odisea, gracias por estar siempre para mí. Sin su ayuda esta historia hubiera sido muy diferente.

A mis queridísimos amigos de marinas a los que me refiero como la "Oceanobandita": A Vladimiro porque juntos cursamos toda la carrera, aunque en ocasiones hubiera que nadar a contracorriente, me llena de orgullo ser tu colega; a Pabis por ser el primer amigo de la universidad y porque para mí su hogar siempre fue sinónimo de un puerto seguro; a Troncoso porque con él al igual que las charlas, los chistes y las risas jamás faltaron, sabes que en mi casa siempre hay un plato listo para tí; a Rubí por ser ese rayito de sol que te alegra con su energía y cálidos saludos cada que nos vemos, el solo hecho de ver su silueta en la niebla es un rayito de felicidad; a Eunice porque no importa el lugar o la hora, ya sea un café, tamales, ver un concierto en el cine o maratonear una serie, cualquier pretexto es bueno para reunirnos, reír un rato y platicar sobre la vida; y a Ale porque su amistad y presencia se ve reflejada de la misma manera que el pan, el vino y la buena comida, aunque tarde, la espera lo vale y se recibe con mucho entusiasmo y felicidad. Fueron ustedes los que convirtieron la Facultad de Ciencias Marinas en mi segundo hogar.

A mis lindas amigas Keyla y Zuleica, con quienes el tiempo compartido nunca es suficiente porque siempre pasa demasiado rápido con su compañía. Aún nos quedan muchos lugares por descubrir.

A mis queridos amigos Rogelio, Fany y Brandon, quienes a pesar del poco tiempo que podemos coincidir, siempre es un placer verlos de nuevo y saber que se han convertido en una estrella de rock, una intrépida pajarera y en un brillante ingeniero. Me alegra verlos triunfar, aunque sea de lejos.

RESUMEN de tesis para obtener el grado de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA que presenta Octavio Vázquez Aparicio, como requisito parcial para su titulación en la Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. Enero 2025.

“Determinación del grado de hidrólisis, digestión *In Vitro* y aminoácidos libres de distintas fuentes proteicas de subproductos terrestres; utilizando extractos enzimáticos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*)”

Resumen aprobado por:

---

Dr. Fernando Barreto Curiel

El atún aleta azul del Pacífico es un organismo de rápido crecimiento y de gran interés para la maricultura, convirtiéndose en un pez con alto valor en el continente asiático. En este contexto, es crucial validar y obtener alimentos balanceados que no generen un alto costo de producción, patologías en los organismos y una mayor contaminación del medio ambiente. Por ende, para este estudio se propuso determinar la digestibilidad *In Vitro*, la proteína soluble y los aminoácidos libres (AALs) presentes en distintas fuentes proteicas como la harina de pescado (HP), harina de concentrado proteico de soya (HCPS), harina de subproducto de ave (HSA), harina de subproducto de cerdo (HSC) y harina de pluma hidrolizada (HPH), utilizando extractos enzimáticos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico. Las fuentes de proteína fueron caracterizadas en su contenido proximal, perfil de aminoácidos (mediante HPLC) y ácidos grasos (mediante cromatografía de gases). Durante la digestión ácida, se observó que la HP mostró un grado de hidrólisis ácido (GH) superior ( $39.9\% \pm 4.9$ ), siendo significativamente diferente al de las demás fuentes proteicas. En contraste, en la hidrólisis alcalina, la HPH presentó un GH de 17.9%, superior y significativamente diferente al resto de las fuentes proteicas. Tras un proceso de digestión continua (ácido-alcalino) se observó que la HCPS presentó el mayor contenido de proteína soluble ( $230.3 \pm 6.0 \mu\text{g mL PS}^{-1}$ ), con diferencias estadísticas ( $p > 0.01$ ) respecto a las demás fuentes proteicas, siendo la HSC la que presentó el menor contenido ( $52.6 \pm 2.9 \mu\text{g mL PS}^{-1}$ ). En cuanto al contenido de AALs después de un proceso de digestión continuo, se encontró que la HP es la fuente proteica con mayor contenido de AALs esenciales ( $6.3 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ ), misma que no mostró diferencias significativas respecto a la HSA ( $6.1 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$ ). La HCPS y HSC mostraron contenidos de AALs esenciales de  $3.2 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que en la HPH se observaron contenidos de  $2.0 \pm 1.0 \text{ mg g}^{-1}$ . Esta misma tendencia se observó para los AALs no esenciales. En conclusión, se infiere que la HSA podría ser la mejor fuente proteica para reemplazar la HP en un alimento balanceado para el atún aleta azul del Pacífico, ya que presenta contenidos similares de AALs después de un proceso de digestión. Se recomienda incrementar  $0.2 \text{ g kg}^{-1}$  de metionina y  $0.4 \text{ g kg}^{-1}$  de lisina en los alimentos balanceados que utilicen la HSA como fuente principal de proteína, con el fin de igualar los contenidos de AALs esenciales y mejorar el desempeño productivo de peces marinos en la acuicultura.

*Palabras claves:* Grado de hidrólisis, digestión, aminoácidos libres, atún aleta azul del Pacífico.

## Contenido

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	7
3. Justificación.....	10
4. Hipótesis .....	11
5. Objetivos .....	12
5.1 Objetivo general .....	12
5.2 Objetivos específicos .....	12
6. Materiales y métodos .....	13
6.1 Análisis proximales.....	13
6.1.1 Proteína cruda.....	13
6.1.2 Lípidos totales.....	14
6.1.3 Cenizas.....	14
6.2 Preparación de extractos enzimáticos.....	14
6.3 Actividad enzimática.....	15
6.4 Grado de hidrólisis .....	17
6.5 Digestión de las harinas .....	19
6.6 Precipitación proteica .....	20
6.7 Cuantificación de proteína soluble .....	21
6.8 Determinación de aminoácidos .....	21
6.9 Determinación de ácidos grasos .....	22
6.10 Análisis estadístico .....	23
7. Resultados .....	24
7.1 Proximales .....	24
7.2 Ácidos grasos.....	25
7.3 Perfil aminoácidos de las fuentes proteicas .....	26
7.4 Actividad enzimática de extractos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). .....	28
7.5 Grados de hidrólisis.....	29
7.6 Proteína soluble .....	31
7.7 Aminoácidos libres .....	33
7.8 Tiempo de hidrólisis ácida y alcalina .....	34

8. Discusiones.....	36
9. Conclusiones.....	45
10. Recomendaciones .....	46
11. Referencias .....	47



## Índice de tablas

Tabla 1. Contenido proximal de las harinas utilizadas para la determinación del grado de hidrólisis, utilizando extracto enzimático crudo de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). .....	25
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de las harinas utilizadas para determinar el grado de hidrólisis ácido y alcalino con extracto enzimático de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). Los resultados están dados en porcentaje de ácidos grasos metilados.....	26
Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las distintas harinas utilizadas para medir el grado de hidrólisis ácido y alcalino con extracto enzimático de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). Las unidades están por el porcentaje total de aminoácidos determinados, respecto a la proteína.....	27
Tabla 4. Perfil de AAs libres de las fuentes proteicas después de digestión continua, hidrolizadas con extractos enzimáticos ácidos y alcalinos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). .....	33

## Índice de figuras

Figura 1. Titulador automático pH STAT (Mod. 902 Titrand; marca Metrohm)...	18
Figura 2. Grado de hidrólisis tras 15 min de digestión ácida con extracto enzimático de estómago de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). Las fuentes proteicas se definen como; Harina de pescado (HP), Harina de concentrado proteico de soya (HCPS), Harina de subproducto de ave (HSA), Harina de carne y hueso de cerdo (HSC) y Harina de pluma hidrolizada (HPH). .	30
Figura 3. Grado de hidrólisis tras 45 min de digestión alcalina con extracto enzimático de páncreas de atún aleta azul del Pacífico ( <i>Thunnus orientalis</i> ). Las fuentes proteicas se definen como; Harina de pescado (HP), Harina de concentrado proteico de soya (HCPS), Harina de subproducto de ave (HSA), Harina de carne y hueso de cerdo (HSC) y Harina de pluma hidrolizada (HPH). .	31
Figura 4. Contenido de proteína soluble después de digestión. Las fuentes proteicas se definen como; Harina de pescado (HP), Harina de concentrado proteico de soya (HCPS), Harina de subproducto de ave (HSA), Harina de carne y hueso de cerdo (HSC) y Harina de pluma hidrolizada (HPH).....	32
Figura 5. Tiempo de hidrólisis ácido con HP y extracto enzimático de estómago de AAAP indicando en qué momento el rompimiento de enlaces peptídicos tiende a cero durante la hidrólisis ácida. ....	35
Figura 6. Tiempo de hidrólisis alcalino con HP y extracto enzimático de estómago del AAAP indicando en qué momento el rompimiento de enlaces peptídicos tiende a cero durante la hidrólisis alcalina. ....	36

## 1. Introducción

El atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*) es un organismo de rápido crecimiento y de gran interés para la maricultura, mostrando crecimientos de 1.5 m a 2.0 m entre 5 y 9 años respectivamente (Shimose et al., 2009). Sin embargo, se han registrado organismos con un peso de hasta 300kg y con longevidad de hasta 30 años, demostrado por los años transcurridos con las lecturas de los anillos de los otolitos de los organismos capturados (Foreman e Ishizuka, 1990; Neilson y Campana, 2008).

En este mismo sentido se sabe que el atún aleta azul del Pacífico (AAAP) es un organismo migratorio y se distribuye desde el Océano Pacífico Norte hasta el Este de Taiwán (Bayliff, 1994). De manera particular, el AAAP se alimenta de peces pelágicos, por lo que es considerado un organismo carnívoro y de un nivel trófico 4.0 (Sarà y Sarà, 2007). Sin embargo, son las características de la carne lo que determina su demanda y alto valor principalmente en el mercado asiático, siendo algunas de estas la frescura, el contenido de grasa, color de la carne y su sabor único (Mateo et al., 2007; Buentello, 2016); siendo Japón el país de mayor consumo debido a algunos de los platillos típicos de su gastronomía, como el sushi y sashimi (Majkowski, 2007).

El alimento suministrado al cultivo de atunes puede ser una dieta balanceada, hecha a base de harina y aceite de pescado como sus principales fuentes de proteína y lípidos, o pueden utilizarse peces frescos (Sardina, anchoveta, macarela, etc.), sin embargo, la disponibilidad de alimento balanceado es muy baja o casi nula (Murashita et al., 2021). En este mismo sentido, se ha observado que el alimento balanceado que existe hoy en día genera altos factores de conversión alimenticia, sin embargo, también presenta un alto costo de producción, patologías y una mayor contaminación en el medio ambiente.

Aún así, la alternativa de continuar alimentando el atún con pescado fresco o congelado, resulta insostenible a largo plazo, debido en parte a lo impráctico de la logística que resulta en capturar, almacenar y transportar el pescado hasta el maricultivo, el cual no siempre se encuentra en una zona cercana, además de que el pescado capturado no siempre es de la calidad requerida, lo que puede provocar problemas nutricionales a largo plazo, a esto se suma la posibilidad de que el pescado sea un vector para distintas enfermedades y/o parásitos (Benetti et al., 2016; Biswas et al., 2009; Ji et al., 2008).

Harina de pescado (HP) es un ingrediente que se ha utilizado ampliamente para la elaboración de alimentos en una gran variedad de animales terrestres y acuáticos, sin embargo, es en el área de la acuicultura que este ingrediente toma una mayor importancia, principalmente en peces, dónde sus alimentos contienen la HP como un componente fundamental. Como ejemplos se pueden mencionar los alimentos destinados a salmones, truchas, lobinas, besugos y lenguados, por mencionar algunos (Tacon y Metian, 2008).

HP proviene principalmente de la captura de pelágicos menores (Pm) como la sardina, anchoveta y macarela, peces que por ser una excelente fuente de proteína son capturados específicamente para la elaboración de HP (Pauly et al., 2002); y la demanda de la HP ha aumentado a medida que también lo ha hecho la actividad acuícola en el mundo, así como también otras industrias que utilizan la HP como materia prima para la elaboración de alimentos destinados a aves de corral, cerdos, mascotas, entre otras (Sheperd y Jackson, 2013).

El incremento de la demanda de HP por parte de estas industrias se debe al incremento de la población humana, lo que da como consecuencia directa una mayor demanda de alimentos para satisfacer la población mundial, una demanda que desde hace dos décadas la pesca no ha podido satisfacer por sí misma, siendo la acuicultura la actividad que complementa la creciente demanda de productos acuáticos (Boyd et al., 2022).

Este hecho ejerce una gran presión en las poblaciones de Pm capturadas con la finalidad de producir HP, las cuales, actualmente se encuentran sobreexplotadas o en el mejor de los casos explotadas a su máximo nivel de captura sostenible; lo que provoca que las capturas de estas especies tiendan a ir en declive, fluctúen cada temporada y que se dificulte la estimación de los tamaños de poblaciones. Además, también resultan afectadas las cadenas tróficas, donde los Pm suelen ser un eslabón esencial al ser uno de los alimentos principales de una gran variedad de especies marinas (Cashion et al., 2017; Pauly et al., 2002).

La controversia por la captura de peces para realizar HP que tiene como finalidad el alimentar a otros peces no termina aquí, también desde hace varios años existe la discusión sobre si los Pm deben seguir capturándose principalmente para la elaboración de HP, ya que por su contenido proteico son una excelente opción como alimentos de calidad para el consumo humano directo (Tacon y Metian, 2008). Las cifras del año 2018 (FAO, 2020) arrojan que se utilizaron 18 millones de toneladas para la producción de harina y aceite de pescado, una cantidad de pescado que sería de gran ayuda para combatir el hambre y la desnutrición a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo (Tacon y Metian, 2009).

Por tal motivo, en las últimas décadas se han desarrollado un gran número de investigaciones, enfocadas en buscar alternativas para reemplazar a la harina y aceite de pescado como las principales fuentes de proteína y lípidos en la fabricación de dietas destinadas a la acuicultura (Mendoza et al., 2001; Wu et al., 2021), buscando obtener alimentos que logren satisfacer las necesidades nutricionales de las especies a cultivar, a bajo costo y con un bajo impacto al medio ambiente.

Por otro lado, una de las fuentes de reemplazo más utilizadas en la actualidad es la harina de concentrado de soya (HCPS) y sus concentrados proteicos, ya que el precio es muy competitivo, sin embargo, a pesar de que la HCPS ha sido reconocida

como una de las mejores alternativas de reemplazo para la HP debido a su alta disponibilidad de materia prima, bajo costo comparado con la HP (700 dls vs 2300 dls), un alto contenido de proteína en la harina (42-48%) y un perfil de aminoácidos adecuados para algunos peces u organismos herbívoros y omnívoros, en este mismo sentido, no contiene un perfil de aminoácidos adecuado que cubra las necesidades nutricionales de peces carnívoros marinos (Poot-López et al., 2010; Lin y Luo, 2011; Wang et al., 2017; Ye et al., 2019).

Diversos autores señalan efectos neutros en afección y reemplazo parcial y total de HP por harinas o concentrados de soya en distintas especies, tales como abulón (Cho, 2010), trucha arcoíris (Zhang et al., 2012), esturión siberiano (Yun et al., 2014), corvina (Minjarez-Osorio et al., 2016), lenguado (Valente et al., 2016) y totoaba (Bañuelos-Vargas et al., 2014; Toledo et al., 2014; López et al., 2015; Fuentes-Quesada et al., 2018).

Sin embargo, existe evidencia que se han presentado diferentes problemas fisiológicos y patológicos, tales como factores anti nutricionales, déficit en aminoácidos esenciales, baja digestibilidad, carbohidratos no solubles y síndrome de intestino irritable (también conocido como enteritis) en la mayoría de peces carnívoros de origen marino, así como también, el hecho de tener un sistema digestivo que no es capaz de aprovechar completamente las proteínas de origen vegetal por ser peces carnívoros (Nguyen y Davis, 2009; Daniel, 2018; Fuentes-Quesada et al., 2018).

Debido a las limitaciones que ha presentado la soya como sustituto para la HP, también se han realizado investigaciones con harinas de subproductos terrestres (HSPT), estas pueden ser de origen vegetal o animal, siendo estas últimas las más estudiadas para ser incluidas en dietas de peces carnívoros. Entre las ventajas que presenta el utilizar las HSPT de origen animal se han descrito como buenas fuentes de proteína, aminoácidos, ácidos grasos entre otros nutrientes. Además, a esto, se suma el reciclaje de nutrientes, dado que estas harinas utilizan partes de animales

que no se aprovechan para consumo humano o que no lo hacen al mismo nivel que la carne, como son las vísceras, sangre, cartílago, pluma o hueso (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008; Bureau, 2001; Llanes-Iglesias y Toledo Pérez, 2015).

La inclusión de este tipo de ingredientes para dietas no es algo nuevo, es una práctica bastante común para elaborar dietas para animales domésticos como perros o gatos (Murray et al., 1997), sin embargo, esta es una industria que actualmente se encuentra muy especializada y lleva décadas de investigación y desarrollo, siendo desde finales del siglo XIX que surge un mercado enfocado en alimentos para mascotas; en contraste con las dietas enfocadas en peces las cuales empezaron a ver un crecimiento importante apenas a mediados de los setentas (Hardy y Kaushiki, 2021; Coffey et al., 2016).

Aún así, se han realizado diversos experimentos de sustitución de HP con HSPt con distintas especies de importancia acuícola, tanto en peces como en crustáceos, siendo algunos de los ejemplos trucha arcoíris (Alexis et al., 1985 y Steffens, 1994), langostino malayo (Tidwell et al., 1993), corvina roja (Kureshy et al., 2000), dorada (Nengas, 1999), mero moteado (Millamena, 2002), totoaba (Badillo-Zapata et al., 2016 y 2023; Barreto-Curiel et al., 2018), entre otros. A pesar de que las HSPt son altas en proteína, esta no suele ser aprovechada o digerida de la misma forma que la HP, en parte porque muchas de estas harinas tienen partes de hueso, cartílago o tejido conectivo, material que suele ser difícil para su digestión (Brunson et al., 1997).

La digestibilidad *In Vivo* o *In Vitro*, son técnicas que han sido ampliamente utilizadas (Glencross et al., 2007; Silva et al., 2014; Peña et al., 2017; Barreto et al., 2023) para poder determinar directa o indirectamente la calidad proteica y así, evaluar el efecto de las distintas harinas alternativas que se podrían utilizar en el remplazo parcial o total de la HP. De manera particular, la técnica de digestibilidad *In Vivo*, es la técnica que nos muestra resultados más fidedignos, ya que es utilizado el

ingrediente y la especie a la que se requiere evaluar, sin embargo, implica la realización de un experimento de largo tiempo midiendo dosis respuesta.

Por su parte, la digestibilidad *In Vitro*, es una técnica rápida de realizar y se utilizan los extractos enzimáticos de la especie a estudiar, midiendo los Grados de Hidrólisis (GHs) ácidos y alcalinos de las distintas fuentes proteicas (Silva et al., 2014; Mirzakhani et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos en la digestibilidad *In Vitro*, no siempre reflejan una digestión *In Vivo*. Esto se le ha atribuido a la composición química, tipo de ingrediente, edad del organismo, capacidad digestiva, absorción de nutrientes, entre otras características (Peña et al., 2017).

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es determinar la hidrólisis ácida y alcalina de la HCPS y otras HSPt, utilizando extractos enzimáticos que fueron obtenidos del estómago y páncreas del AAAP. Dando así una proyección de las posibles fuentes proteicas que pudieran utilizarse en la formulación de alimentos balanceados para atún aleta azul, lo que propulsaría el uso de alimentos formulados en la industria de la engorda del atún.



## 2. Antecedentes

De manera general, se sabe muy poco acerca de los posibles ingredientes que pudieran ser utilizados para la formulación de los alimentos balanceados para el AAAP. En este mismo sentido, Kondo y colaboradores (2016) realizaron una prueba de alimentación en el atún rojo (*Thunnus orientalis*) con alimento formulado y pescado crudo. Los autores observaron que los organismos alimentados con alimento formulado disminuyeron su crecimiento y la actividad de la pepsina en las primeras semanas de cultivo, posteriormente fueron equilibradas estas variables de respuesta, por lo que el atún rojo, tiene la plasticidad de equilibrar su fisiología digestiva y así, obtener un mayor aprovechamiento del alimento para poder crecer de forma eficiente.

La digestibilidad *In Vitro*, es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la digestibilidad de ingredientes o alimentos que son utilizados para alimentar a los organismos acuícolas, mostrando los grados de hidrólisis (rompimiento de enlaces peptídicos en un ambiente ácido y alcalino) que puede presentar las fuentes proteicas (Glencross et al., 2007). Sin embargo, es una técnica que no siempre muestra las tendencias o comportamientos de una digestibilidad *In Vivo* (Barreto et al., 2023). Esta discrepancia pudiera ser atribuidas a la composición proximal de los ingredientes, alimentos y a la capacidad enzimática que tenga cada organismo para el aprovechamiento de los nutrientes (Peña et al., 2017).

Román-Gavilanes y colaboradores (2015), determinaron el grado de hidrólisis de la harina de pescado y soya con pepsina porcina y extracto enzimático de páncreas del AAAP, los resultados indican que la HCPS mostró un mayor grado de hidrólisis respecto a la HP, sin embargo, la HP mostró un mayor contenido de péptidos de menor tamaño, mismo que se determinaron en 150kDa con un 35% más que en la HCPS. Bajo estas premisas los autores sugieren que obtener péptidos más pequeños en una hidrólisis, generará un mayor aporte nutricional a los organismos acuáticos.

En este mismo sentido, Castillo-López y colaboradores (2016), determinaron la digestibilidad *In Vitro* de la HP versus subproducto de ave (HSA) utilizando pepsina porcina y extracto enzimático del páncreas del AAAP. Los resultados muestran que la HP presentó diferencias significativas y una mejor digestibilidad (68.9%) respecto a la HSA, la cual obtuvo un valor de digestibilidad del 57.2%. Sin embargo, no se observaron diferencias en los pesos moleculares que se encontraron en ambas fuentes proteicas. Por tal motivo, los autores consideran que la HSA pudiera ser utilizada en la formulación de alimentos balanceados.

Peña y colaboradores (2017) determinaron el grado de hidrólisis y el total de aminoácidos libres entre dos grupos de peces, juveniles (21g) y adultos (400g), de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Se realizaron extractos enzimáticos de la misma especie y se evaluaron 13 fuentes proteicas distintas de origen marino, terrestre (animal y vegetal). Los autores encontraron que la HP y la harina de calamar, fueron las que presentaron un mayor grado de hidrólisis alcalina, seguido de harina de cerdo y subproducto de ave, como fuentes reciclables y, por último, las fuentes vegetales, harina de soya y canola. En este mismo sentido, los autores realizaron un zimograma de las enzimas digestivas alcalinas y observaron que la especie presenta un cambio en las enzimas digestivas a lo largo de su vida, impactando en los grados de hidrólisis de las distintas fuentes proteicas.

Por otro lado, Barreto y colaboradores (2023) determinaron la digestibilidad *In Vitro* e *In Vivo* de la HP, HSA, mezcla proteica (Portiblend), harina de canola, harina de soya y harina de gluten de trigo en pargo de cola amarilla (*Ocyurus chrysurus*). Los autores observaron que HP, HSA y harina de ave, mostraron un alto grado de digestibilidad *In Vitro*. Sin embargo, al comparar la digestibilidad *In Vivo*, se observó que HSA mostró una digestibilidad aparente menor con respecto a la HP y harina de ave, así como, un incremento en la harina de canola. Por tal motivo, los autores concluyen que la harina de canola, puede ser un ingrediente provisorio para la elaboración de alimento balanceado con énfasis en peces carnívoros marinos.

Guerrero-Zarate y colaboradores (2024), evaluaron la digestibilidad *In Vitro* de fuentes proteicas y lipídicas en juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). De manera particular, los autores encontraron un alto valor relativo de digestibilidad en la harina de pescado, de camarón, de bovino, de subproducto de pollo y de sangre de bovino. En lo que respecta a las fuentes lipídicas, la lecitina de soya, hígado de bacalao, soya, oliva, maíz y canola. De manera general, el pejelagarto mostró un amplio abanico de ingredientes que puede ser utilizados como posible fuente de sustitución parcial o total de harina y aceite de pescado.

### 3. Justificación

Uno de los principales objetivos de la nutrición acuícola, es el reemplazo parcial o total de los ingredientes de origen marino que se incluyen en los alimentos balanceados, principalmente la harina y el aceite de pescado. Estos ingredientes contienen nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos acuáticos que ante un déficit de estos pueden llegar a ser limitantes de este, gracias a su excelente contenido de aminoácidos y ácidos grasos esenciales. Sin embargo, en las últimas décadas se han buscado diferentes fuentes terrestres de sustitución proteica, generando resultados con un mínimo de inclusión o en su defecto, generando patologías como hígado graso, hígado verde o enteritis en peces carnívoros.

En este mismo sentido, existe muy poca información y dietas a nivel comercial que ayuden a fomentar el cultivo del atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*), por lo tanto, el conocer el grado de hidrólisis de distintas fuentes proteicas de origen terrestre (tanto animal como vegetal), permitirá generar información o conocimiento que pueda ayudar a la industria atunera a formular y diseñar alimentos balanceados para esta especie para sus distintas etapas de desarrollo, para lograr un mejor aprovechamiento de los recursos naturales disponibles.

#### **4. Hipótesis**

Las proteasas ácidas y alcalinas presentes en el estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico, permitirán medir el grado de hidrólisis de las HSPT y cuantificar los aminoácidos libres que presenten cada una de las harinas tras un proceso de digestión continua, para determinar su potencial como posibles sustitutos de la harina de pescado en alimentos para el atún aleta azul del Pacífico.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar el grado de hidrólisis, digestión *In Vitro* y aminoácidos libres de distintas fuentes proteicas de subproductos terrestres; utilizando extractos enzimáticos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*).

### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad enzimática de proteasas ácidas y alcalinas presentes en los extractos enzimáticos crudos del atún aleta azul.
- Caracterizar las fuentes proteicas vegetales y animales en su contenido proximal, perfil de aminoácidos y ácidos grasos.
- Determinar el grado de hidrólisis de las fuentes proteicas vegetales y animales.
- Analizar la digestibilidad *In Vitro* por medio de un proceso continuo, para determinar la cantidad de aminoácidos libres presentes en las harinas de fuentes proteicas vegetales y animales.
- Cuantificar el contenido de proteína soluble después de un proceso de digestibilidad *In Vitro* de las distintas fuentes proteicas vegetales y animales.
- Determinar el tiempo de hidrólisis mediante un análisis de broken-Line.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Análisis proximales.**

Los análisis proximales fueron realizados por triplicado siguiendo las metodologías propuestas por la “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1990).

A cada una de las fuentes proteicas: harina de subproducto de ave (HSA), harina de subproducto de cerdo (HSC), harina de pluma hidrolizada (HPH), harina de pescado (HP) y harina de concentrado proteico de soya (HCPS), se les determinó la concentración de proteína, lípidos y cenizas en base a muestras secas. El extracto libre de nitrógeno (ELN) se obtuvo por diferencia (Jobling, 2001).

#### **6.1.1 Proteína cruda.**

Para obtener el contenido de proteína cruda de cada una de las harinas, se utilizó el método de Micro-Kjeldahl, para ello, en el proceso de digestión se utilizaron 2 g de sulfato de potasio, 40 mg de sulfato cúprico con 50 mg de muestra (previamente pulverizada) y 3 mL de ácido sulfúrico durante cuatro horas en un digestor. Una vez digeridas las muestras (mostrando un color azul cristalino), se aforaron en un matraz volumétrico a un volumen de 25 mL y posteriormente se destilaron.

Para el proceso de destilación, se utilizaron 10 mL de hidróxido de sodio al 40%, 5 mL de la muestra digerida y 10 mL de agua destilada. El resultado de la destilación fue condensado y retenido en un vaso de precipitado, al cual, previamente se le añadieron 15 mL de ácido bórico al 3 % y 3 gotas de solución indicadora Shiro tashiro; esto, con la finalidad de capturar amoniaco y transformarlo a amonio. El porcentaje de proteínas en las muestras se obtuvo mediante un factor establecido de 6.25 de acuerdo con la AOAC (1990).

### **6.1.2 Lípidos totales**

Para la determinación de lípidos totales se siguió la técnica descrita por Folch (1957). Como primer paso se pesaron por triplicado 0.1 g de cada muestra en un tubo de ensayo previamente etiquetado. Tras haber pesado las muestras, se agregaron 200 µL de agua destilada y se mezclaron en vortex por 30 segundos. Se agregaron 6 ml de solución diclorometano:metanol (2:1) a cada tubo, se agitaron en vortex por 3 min y se dejó reposar las muestras por 12 horas.

Las muestras fueron filtradas por medio de jeringas plásticas de 10 mL, filtros plásticos de rosca y papel Whatman #4; ya filtradas las muestras se le agregó a cada tubo de ensayo 1.5 mL de cloruro de potasio al 1.76 %. Posterior a ello, en cada vial pesado a 4 decimales, se colocaron 2 mL de muestra provenientes del tubo de ensayo; los viales fueron colocados en un thermoblock Cole-Parmer por 20 min o hasta que se evaporó por completo el solvente, una vez evaporado se dejaron atemperar los viales para después registrar su peso.

### **6.1.3 Cenizas**

El valor promedio de contenido de cenizas se calculó por gravimetría. Se pesaron tres réplicas por muestra de 1 g cada una, estas fueron calcinadas a 550 °C en una mufla Furnace 6000 durante 5 horas. Una vez transcurrido este tiempo las muestras fueron colocadas en un desecador hasta obtener temperatura ambiente, para después ser pesadas, a partir de la diferencia de pesos se calculó el porcentaje de ceniza de las muestras.

## **6.2 Preparación de extractos enzimáticos**



Para la preparación de extractos de estómago del atún, se tomó un total de 500 g de tejido combinado de tres organismos distintos. Los tejidos fueron licuados (licuadora Vitamix) con 1000 mL de agua destilada, previamente ajustada a pH de 3.5. La mezcla fue colocada en seis tubos falcón de 50 mL y se centrifugaron las muestras a 14,000 g's por 30 min a 4 °C en una centrífuga (Thermo Fisher Scientific Megafuge 16R). Una vez centrifugados los extractos se procedió a filtrar el sobrenadante, y este se almacenó en alícuotas de 25 mL y 2 mL, las cuales fueron almacenadas a -80 °C en un ultracongelador Thermo Scientific Revco UxF hasta su posterior uso.

Para la preparación de extractos alcalinos se tomó un total de 500 g de tejido combinado de tres páncreas de atún y se licuaron con 1500 mL de agua destilada ajustada a pH de 8.0. Posteriormente, el extracto fue colocado en seis tubos falcón de 50 mL y se centrifugaron las muestras a 14,000 g por 30 min a 4 °C. Una vez centrifugados los extractos enzimáticos, se procedió a filtrar el sobrenadante, el cual se almacenó en alícuotas de 25 mL y 2 mL, a -80 °C en un ultracongelador Thermo Scientific Revco UxF hasta su uso.

### **6.3 Actividad enzimática**

La actividad enzimática de proteasas totales (AEP) presentes en los extractos enzimáticos de estómago y páncreas de atún, se determinó utilizando las metodologías descritas por Nolasco-Soria y colaboradores (2020).

Para las proteasas ácidas, en un tubo eppendorf se agregaron 125 µl de solución de hemoglobina al 0.5 % a pH 2.0, 125 µl de agua destilada y 20 µl de extracto enzimático de estómago previamente descongelado (diluido 1:4). Las muestras fueron agitadas en un vortex y se incubaron a 25 °C (Matus de la Parra et al., 2007) por 60 min en una estufa BINDER. Tras la incubación se agregaron 125 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, se agitó la mezcla y se incubó a 25 °C por 10 min.

Una vez finalizada la segunda incubación, se centrifugaron los tubos a 13,000 g's por 5 min, se tomaron 25 µl del sobrenadante que se colocaron en un pocillo de microplaca, a este mismo pocillo se agregó también 25 µl de agua destilada y 200 µl del reactivo OPA-DTT descrito por Nolasco-Soriay y colaboradores (2020).

La reacción fue incubada a temperatura ambiente por 10 min, para posteriormente agitar la placa por 10 segundos y leer a 330 nm en un espectrofotómetro. Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas y 3 blancos, para estos últimos, el procedimiento fue idéntico que con las réplicas con la excepción de que el extracto enzimático se colocó hasta después de haber agregado el TCA al 20 %.

Para las proteasas alcalinas, en un tubo eppendorf se agregaron 125 µl de solución de caseína al 1 % a pH 7.5, 125 µl de agua destilada y 20 µl de extracto enzimático de páncreas previamente descongelado (diluido 1:4), tras esto se agitaron las muestras en vortex y se incubaron las muestras a 25 °C (Matus de la Parra et al., 2007) por 60 min en una estufa. Tras la incubación, se agregaron 125 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 16 %, se agitó la mezcla en vortex y se incubó la muestra a 25 °C por 10 min. Una vez finalizada la segunda incubación, se centrifugaron los tubos a 13,000 g's por 5 min. Se tomaron 25 µl del sobrenadante y se colocaron en un pocillo de microplaca, a este mismo pocillo se agregó también 25 µl de agua destilada y 200 µl del reactivo OPA-DTT descrito por Nolasco-Soria y colaboradores (2020).

Una vez colocados estos reactivos en microplaca se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min, para posteriormente agitar la placa por 10 segundos y leer a 330 nm en un espectrofotómetro. Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas y 3 blancos, para estos últimos el procedimiento fue idéntico que con las réplicas con la excepción de que el extracto enzimático se colocó hasta después de haber agregado el TCA al 16 %.

Para la cuantificación de actividad enzimática total ( $U\ mL^{-1}$ ) se realizaron los cálculos siguiendo lo descrito por Peña y colaboradores (2015), la fórmula empleada se describe a continuación.

ó

$$\text{Actividad total (U mL}^{-1}\text{)} = [\Delta_{\text{abs}} \times \text{Volumen total (mL)}] / [\text{CEM} \times \text{tiempo de incubación (min)} \times \text{Volumen de extracto enzimático (mL)}] \times \text{Factor de dilución (1:4)}$$

CEM: Coeficiente de extinción molar de tirosina o p-nitroanilina

#### **6.4 Grado de hidrólisis**

Para cuantificar el grado de hidrólisis de cada uno de los ingredientes, se procedió romper la capacidad buffer de las fuentes proteicas. Para ello, en un vaso de precipitado de 10 mL fueron colocados el equivalente a 40 mg de proteína de cada una de las harinas y la muestra fue homogenizada en 7 mL de agua destilada. Una vez homogenizada la muestra, para digestibilidad ácida, se utilizó una solución de NaOH 3N y esta misma era titulada mediante el titulador automático pH STAT (Figura 1) por 15 min a 25 °C con HCl al 0.5N. La cantidad de  $\mu\text{L}$  de solución gastada de HCl 0.5N para mantener el pH a 3.5 fue registrado como blanco o capacidad buffer (Peña-Marín, 2016). El procedimiento se repitió por triplicado para cada una de las harinas analizadas.



Figura 1. Titulador automático pH STAT (Mod. 902 Titrand; marca Metrohm)

En el caso de los blancos para el grado de hidrólisis alcalina, la solución usada para romper la capacidad buffer fue NaOH 3N, y la muestra fue titulada en el pH STAT por 45 min a 25 °C. La cantidad de  $\mu\text{L}$  de solución gastada de NaOH para mantener el pH a 8.0 fue registrado como blanco o capacidad buffer (Peña-Marín, 2016). El procedimiento se repitió por triplicado para cada una de las harinas analizadas.

Una vez obtenidos los blancos, ambos procesos fueron repetidos, con la diferencia de agregar 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático de estómago de atún para simular la digestión ácida, mientras que para simular la digestión alcalina se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático de páncreas de atún. Estos procedimientos también se realizaron por triplicado.

Una vez obtenidos estos datos se procedió a cuantificar el grado de hidrólisis (GHs), siguiendo lo descrito por Adler-Nissen (1986) la fórmula empleada se describe a continuación.

$$\text{GHs (\%)} = B \times \text{NB} \times 1/\alpha \times 1/\text{MP} \times 1/\text{htot} \times 100 \%$$

Donde B representa el volumen de la solución NaOH o HCl gastados por el titulador automático para mantener constante el pH, NB es la normalidad de esas soluciones (0.5 N en este caso),  $1/\alpha$  es el grado medio de disociación de los grupos  $\alpha$ -amino relacionada con el pK de los grupos amino al pH y temperatura de la reacción, MP es la masa (g) de proteína presente en la reacción y htot es el número de enlaces peptídicos para una fuente de proteína específica.

## **6.5 Digestión de las harinas**

Una vez obtenido el grado de hidrólisis se realizó la digestión de las harinas a una escala mayor, pero manteniendo las mismas proporciones de proteína y extracto enzimático. Para escalar el proceso, se pesó la harina equivalente a 8 g de proteína, la cual fue disuelta con 400 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, para disolver la mezcla usando una plancha de calentamiento y un magneto a una temperatura de 25 °C.

Tras mantener de forma constante la temperatura de 25 °C, se inició con el proceso de digestión, para ello, se utilizó HCl 1N para ajustar el pH a 3.5. Se agregaron 10 mL de extracto de estómago de atún, se monitoreó y ajustó el pH de forma manual por 16.5 min. Al finalizar el tiempo de digestión ácida, se incrementó el pH a 8.0 con NaOH 1N, con el propósito de detener el proceso. Una vez alcanzado este punto, se agregaron 6 mL de extracto enzimático de páncreas de atún, iniciando la digestión alcalina, la cual, se mantuvo por 45 min ajustando el pH de forma manual con la misma solución de NaOH 1N.

Una vez finalizado el tiempo para la digestión alcalina, la reacción se detuvo sumergiendo el matraz en baño maría a 75 °C por 20 min para inactivar las enzimas por medio de calor (Román-Gavilanes et al., 2015). El procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las harinas analizadas.

## **6.6 Precipitación proteica**

Una vez finalizado el proceso de digestión de cada réplica, se tomaron tres alícuotas de 50 mL, las cuales fueron colocadas en tubos falcón del mismo volumen, estos, fueron centrifugados a 3600 rpm por 10 min a 4 °C en una centrífuga Thermo Fisher Scientific Megafuge 16R. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL del sobrenadante y se transfirieron a tubos eppendorf previamente rotulados, los cuales fueron almacenados en ultracongelador Thermo Scientific Revco UxF a -80 °C para su uso posterior. De cada una de las alícuotas se cuantificó la proteína soluble por medio de Bradford.

Del mismo tubo falcón se tomó 1 mL del sobrenadante y, siguiendo la metodología de desproteización de ABCAM (s.f.), a cada muestra por separado se le agregaron 250 µL de ácido perclórico 4M, se mezcló la solución con un vortex por 20 segundos y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. Se tomaron 1000 µL del sobrenadante y se colocaron en otro tubo eppendorf. El sobrenadante se neutralizó con el equivalente al 34 % V/V (340 µL) del volumen de hidróxido de potasio al 4M. La solución fue mezclada con vortex por 20 s, tras lo cual se ventiló la solución para dejar escapar el CO<sub>2</sub>, y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. Al finalizar se tomaron 1000 µL de sobrenadante y se guardaron en un tubo eppendorf limpio y previamente rotulado, el cual fue almacenado en ultracongelador Thermo Scientific Revco UxF a -80 °C para determinar el contenido de aminoácidos libres.

## **6.7 Cuantificación de proteína soluble**

Se siguió la metodología descrita por Bradford (1976). Para la cuantificación de proteína soluble en el sobrenadante de las digestiones de las harinas, fue utilizado el kit “Quick Start™ Bradford Protein Assay” de Bio-Rad. La metodología de Bradford se realizó en microplaca, por cada repetición de las harinas digeridas fueron determinadas seis réplicas y dos blancos. La placa fue medida por medio de un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go a 595 nm. Los blancos fueron utilizados para corregir la muestra y el ajuste de paso de luz fue determinado a 1 cm.

## **6.8 Determinación de aminoácidos**

Para el análisis de aminoácidos (AAs) en las harinas, se tomaron 100 mg de las muestras previamente desgrasadas y secas, estas fueron hidrolizadas hasta nivel de AAs agregando 5 mL de una mezcla de HCl 6N con 0.06 % de fenol en viales de vidrio de 25 mL. La hidrólisis de las muestras se llevó a cabo incubando las muestras a 113 °C por 18 horas en una estufa BINDER, y una vez pasado este tiempo los viales fueron atemperados en un desecador. Ya atemperadas las muestras, estas fueron llevadas a un volumen final de 100 mL usando para ello un matraz de aforación de 100 mL, y tras esto, se filtró un volumen de 1.5 mL con ayuda de acrodiscos de 0.45  $\mu$  (P.N. 4426T), el cual fue colocado en un vial ámbar previamente limpio y calcinado. Las muestras fueron refrigeradas a -4 °C hasta su procesamiento en HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Para el caso de AAs libres de las harinas digeridas, se filtró 1.0 mL de muestra por medio de acrodiscos de 0.45  $\mu$  (P.N. 4426T) y fue colocado en un vial ámbar previamente limpio y calcinado. Las muestras fueron refrigeradas a -4 °C hasta su procesamiento en HPLC.

La derivatización de las muestras se realizó directamente en el HPLC Agilent (Mod. 1200 infinity series), para ello se tomaron 2.5 µl del buffer de fosfatos (Part Num. 5061-3339), seguido de 0.5 µl de muestra con relación 1:1 de OPA:FMOC (Ortoftaldehido:Fluorenylmethyloxycarbonyl), posteriormente las muestras fueron inyectadas en secuencia continua 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 3.5 µm, P.N. 963400-902), donde se empleó un volumen de inyección de 5 µL. Para la corrida, se utilizó un gradiente de buffer de fosfato de sodio al 40 mM (Sigma Aldrich, cat num. 71500-250g) y una mezcla de acetonitrilo al 45 %, metanol al 45 % y agua grado HPLC al 10 %, a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

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 fueron configurados en dos longitudes de onda, 340/450 nm y 266/305 nm excitación/emisión y para el DAD, 380 nm (OPA) y 262 nm (FMOC). La curva de calibración se realizó utilizando una solución de AAs estándares (P.N. 061-3330) con concentraciones de 50 a 350 pmol. Por último, se estimó el área bajo la curva con el programa "OpenLAB" (Agilent Technologies 2000 copyright), obteniendo así el contenido de AAs.

## **6.9 Determinación de ácidos grasos**

La extracción y metilación de los ácidos grasos se realizó por medio de la técnica descrita por Parrish y colaboradores (2014). Para la "solución extractora" de ácidos grasos se preparó un mix de metanol, diclorometano y ácido clorhídrico (10:1:1, v/v/v). Para cada muestra analizada, se tomaron 100 mg de harina y se incorporaron 3 ml de la solución extractora, 50 µl de BHT (modificación), gas nitrógeno (10 s aproximadamente) y se colocaron a 82 °C durante 2 h. El Butil-hidroxil-tolueno (BHT, C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O) corresponde a una modificación realizada para agregarlo como compuesto antioxidante.



Para la obtención de ácidos grasos estos se separaron, identificaron y cuantificaron con cromatografía de gases, para ello se utilizó un cromatógrafo de gases AGILENT GC 7820A, equipado con un inyector Split/Splitless, un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar AGILENT 122-2361 DB-23 60 m x 0.25 mm con un diámetro interno de 15  $\mu$ m. Los cálculos se efectuaron mediante el software GC Chemstation Data Analysis, mientras que la temperatura inicial de inyección fue de 50 °C por 1 min, después la temperatura se llevó a 190 °C a una tasa de 25 °C min<sup>-1</sup> y se mantuvo por 0 min posteriormente la temperatura se aumentó nuevamente a 230 °C a una tasa de 6 °C min<sup>-1</sup> y se utilizará Nitrógeno (N<sub>2</sub>) como gas acarreador a un flujo de 0.9 mL min<sup>-1</sup>.

Los ácidos grasos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los siguientes estándares: 37 Component FAME Mix (Supelco/Sigma-Aldrich®), GLC 87, GLC 96 (Nu-Chek Prep®), RM-2, RM-6 y GLC 90 (Supelco/Sigma-Aldrich®), además se utilizaron PUFAs de aceites marinos (PUFA1 y 3, Supelco/Sigma-Aldrich®), como patrón de identificación. La composición de cada ácido graso se calculó de acuerdo con el área correspondiente en el cromatograma respectivo.

## **6.10 Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. La normalidad y homocedasticidad se realizó por medio de la prueba de Levenes, una vez obtenida dicha prueba, se realizó un ANOVA de una vía para elucidar las diferencias significativas entre cada una de las harinas evaluadas. Posterior al ANOVA, se realizó un análisis post hoc de Tukey. Respecto a las diferencias, se consideraron estadísticamente significativas cuando  $\alpha < 0.05$ , los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (versión 26.0).

## 7. Resultados

### 7.1 Proximales

El contenido proximal de cada una de las harinas utilizadas para la presente investigación se muestra en la Tabla 1; el contenido de proteína cruda mostró diferencias significativas entre todas las harinas. La HPH fue la que mostró el mayor contenido de proteína ( $80.74 \pm 0.6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), siendo diferente de manera significativa ( $p < 0.05$ ) distinta al resto de las harinas. HSA ( $68.1 \pm 1.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), HP ( $65.5 \pm 0.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), HCPS ( $64.0 \pm 0.3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) y el menor contenido lo mostró la harina de HSC ( $54.1 \pm 3.7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Para el contenido de lípidos también se observaron diferencias entre las harinas, HSA mostró una mayor concentración y diferencia ( $p < 0.05$ ) en el contenido de grasa, siendo de  $16.5 \pm 0.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ , siguiéndole la HSC ( $14.0 \pm 1.1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) y la HPH ( $13.0 \pm 0.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), mismas que no presentaron diferencias entre ambas harinas. El menor contenido de lípidos fue observado en la HCPS, con un contenido de  $2.1 \pm 1.1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ .

En el caso del contenido de cenizas, también se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todas las harinas. La HSC fue la que presentó un mayor contenido que el resto, con un  $26.4 \pm 0.9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ , seguido por la HP, quien presentó  $19.02 \pm 0.58 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  seguida por HSA con su respectivo  $4.7 \pm 0.1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Por último, el extracto libre de nitrógeno (ELN) que fue determinado por diferencia, donde la HCPS por su origen vegetal presentó un valor significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que el resto de las harinas, conteniendo un  $24.3 \pm 0.2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ , de ahí la HSC le siguió en concentración con  $5.1 \pm 2.3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  y luego la HSA con  $1.7 \pm 1.3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ .

Tabla 1. Contenido proximal de las harinas utilizadas para la determinación del grado de hidrólisis, utilizando extracto enzimático crudo de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*).

Nutriente	HP	HCPS	HSA	HSC	HPH
Proteína (g 100g <sup>-1</sup> )	65.5 ± 0.5 <sup>c</sup>	64.0 ± 0.3 <sup>d</sup>	68.1 ± 1.8 <sup>b</sup>	54.1 ± 3.7 <sup>e</sup>	80.7 ± 0.6 <sup>a</sup>
Lípidos (g 100g <sup>-1</sup> )	11.6 ± 0.9 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>d</sup>	16.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.0 ± 1.1 <sup>b</sup>	13.0 ± 0.8 <sup>b</sup>
Cenizas (g 100g <sup>-1</sup> )	19.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>d</sup>	12.8 ± 0.6 <sup>c</sup>	26.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>e</sup>
ELN (g 100g <sup>-1</sup> )	0.6 ± 0.3 <sup>c</sup>	24.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.7 ± 1.3 <sup>bc</sup>	5.1 ± 2.3 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.3 <sup>c</sup>

Diferentes super índice, muestran diferencias significativas p=0.05

HP: Harina de pescado; Procesadora Mar de Ensenada S de RL de CV, Ensenada, México.

HCPS: Harina de concentrado de soya; Silver Cup

HSA: Harina de subproducto de ave; Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV, Guadalajara, México.

HSC: Harina de subproducto de cerdo; Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV Guadalajara, México.

HPH: Harina de pluma hidrolizada; Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV Guadalajara, México.

## 7.2 Ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) de las distintas harinas utilizadas, se muestra en la Tabla 2. De manera general, la HSC fue la que presentó una mayor proporción de SFA con un porcentaje de ácidos grasos metilados del 48.8 ± 0.8 % y mostró diferencias significativas (p<0.05) con el resto de las harinas analizadas. En este mismo sentido, la HP presentó la menor proporción con 39.1 ± 1.6 %.

Con lo que respecta al contenido de MUFAs, la HSA fue la que presentó un mayor porcentaje con 40.0 ± 0.5 %, mostrando diferencias significativas (p<0.05) con el resto de los tratamientos. La HSC y HPH no mostraron diferencias entre ellas, elucidado contenidos promedios de 33.9 ± 0.2 %. El menor contenido de MUFAs se mostró en la HP (4.0 ± 0.1 %). Por otro lado, la HP presentó la mayor concentración de PUFAs (45.23 ± 1.5 %), siendo significativamente distinto (p<0.05) al resto de los

contenidos de las harinas utilizadas. El menor contenido fue observado en la HSC, misma que presentó una concentración con  $13.3 \pm 0.1$  %.

El contenido de ARA, EPA y DHA se muestra en la Tabla 2. De manera particular, la HP fue la única harina que presentó los contenidos de estos ácidos grasos de importancia para peces carnívoros marinos.

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de las harinas utilizadas para determinar el grado de hidrólisis ácido y alcalino con extracto enzimático de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*). Los resultados están dados en porcentaje de ácidos grasos metilados.

Ácidos grasos	HP	HCPS	HSA	HSC	HPH
SFA	$39.1 \pm 1.6^{ab}$	*	$40.6 \pm 0.5^a$	$48.8 \pm 0.8^b$	$42.7 \pm 0.2^c$
MUFAs	$4.0 \pm 0.1^c$	*	$40.0 \pm 0.5^a$	$33.7 \pm 0.7^b$	$34.1 \pm 0.0^b$
PUFAs	$45.2 \pm 1.5^a$	*	$18.0 \pm 0.1^b$	$13.3 \pm 0.1^d$	$15.6 \pm 0.0^c$
ARA	$1.3 \pm 0.1$	*	ND	ND	ND
EPA	$11.3 \pm 0.2$	*	ND	ND	ND
DHA	$27.8 \pm 0.5$	*	ND	ND	ND

Diferentes super índice, muestran diferencias significativas  $p < 0.05$

ND= No determinado

\*En lo referente a los ácidos grasos, la HCPS posee niveles muy bajos de grasa, por lo que no se tomó en cuenta para realizar estos análisis.

### 7.3 Perfil aminoácidos de las fuentes proteicas

En la Tabla 3, se muestran el perfil de aminoácidos de las fuentes proteicas vegetales y animales que fueron utilizadas en este experimento. De manera particular y normalizando lo datos por el contenido de la proteína (NC), se podrá observar que la HP presentó un contenido mayor de aminoácidos esenciales (AAE), mostrando un valor de 0.53 en NC, seguido de la HCPS con 0.51 y el menor contenido normalizado fue observado en el HSC con 0.43. Sin embargo, en los aminoácidos no esenciales (AAANE), no se presentó el mismo contenido, ya que la HP mostró la menor concentración de aminoácidos normalizados con 0.46 y el mayor contenido fue observado en la HSC (0.56).

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las distintas harinas utilizadas para medir el grado de hidrólisis ácido y alcalino con extracto enzimático de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*). Las unidades están por el porcentaje total de aminoácidos determinados, respecto a la proteína.

<b>AAs</b>	<b>HP (%)</b>	<b>HCPS (%)</b>	<b>HSA (%)</b>	<b>HSC (%)</b>	<b>HPH (%)</b>
<b><i>AAAs esenciales</i></b>					
Histidina	2.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
Arginina	5.9 ± 0.2 <sup>c</sup>	7.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	7.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	8.6 ± 0.1 <sup>a</sup>
Treonina	3.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>d</sup>	4.1 ± 0.0 <sup>a</sup>
Valina	2.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.0 <sup>d</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>e</sup>	3.9 ± 0.0 <sup>a</sup>
Metionina	2.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>d</sup>
Lisina	5.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.7 ± 0.0 <sup>d</sup>
Isoleucina	2.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>d</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>e</sup>	3.6 ± 0.0 <sup>a</sup>
Leucina	5.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>d</sup>	7.9 ± 0.0 <sup>a</sup>
Fenilalanina	3.4 ± 0.0 <sup>c</sup>	3.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>d</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>e</sup>	4.5 ± 0.0 <sup>a</sup>

<b>Subtotal</b>	34.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	31.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	29.8 ± 0.5 <sup>d</sup>	22.2 ± 0.6 <sup>e</sup>	37.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
NC	0.53	0.51	0.47	0.43	0.47
<b>AAs no esenciales</b>					
Ácido aspártico	4.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>d</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>c</sup>
Serina	3.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>d</sup>	11.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
Ácido glutámico	8.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	11.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>c</sup>	8.9 ± 0.1 <sup>b</sup>
Glicina	5.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	4.2 ± 0.0 <sup>d</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	11.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.6 ± 0.2 <sup>b</sup>
Alanina	5.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	5.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.0 <sup>a</sup>
Tirosina	2.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>d</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>e</sup>	2.9 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>Subtotal</b>	30.0 ± 0.3 <sup>c</sup>	30.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	32.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	29.0 ± 0.4 <sup>c</sup>	41.0 ± 0.1 <sup>a</sup>
NC	0.46	0.49	0.51	0.56	0.52
Otros					
Taurina	0.6 ± 0.0	nd	1.1 ± 0.1	nd	nd
<b>Total</b>	64.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	62.3 ± 0.9 <sup>c</sup>	63.4 ± 1.3 <sup>bc</sup>	51.2 ± 1.0 <sup>d</sup>	78.4 ± 0.3 <sup>a</sup>

NC=Normalizados por el contenido de proteína= (Sumatoria de AAs esenciales o no esenciales/contenido de proteína cruda de la fuente).

#### **7.4 Actividad enzimática de extractos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*).**

Una vez realizada la metodología para AEP y realizados los cálculos descritos por Peña y colaboradores (2015), se obtuvo que el extracto enzimático de estómago de atún mostró una actividad de  $36.12 \pm 6.48 \text{ U mL}^{-1}$ , por su parte en el extracto enzimático de páncreas de atún se observó una actividad de  $99.04 \pm 5.89 \text{ U mL}^{-1}$ .

## **7.5 Grados de hidrólisis**

Dado que se realizó la digestión ácida y alcalina por separado, se procedió a calcular los grados de hidrólisis de las harinas primero en ácida y después en alcalina. De esta forma la Figura 2, nos muestra la comparación entre grados de hidrólisis tras digestión ácida mientras que la Figura 3 nos muestra los grados de hidrólisis tras la digestión alcalina.

Como se aprecia en la Figura 2, la HP fue la que presentó un mayor grado de hidrólisis con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al resto de las fuentes proteicas, con un  $39.9 \% \pm 4.9$ . De manera contraria, la HSA fue la harina que presentó el menor grado de hidrólisis con un  $4.6 \% \pm 2.9$ .

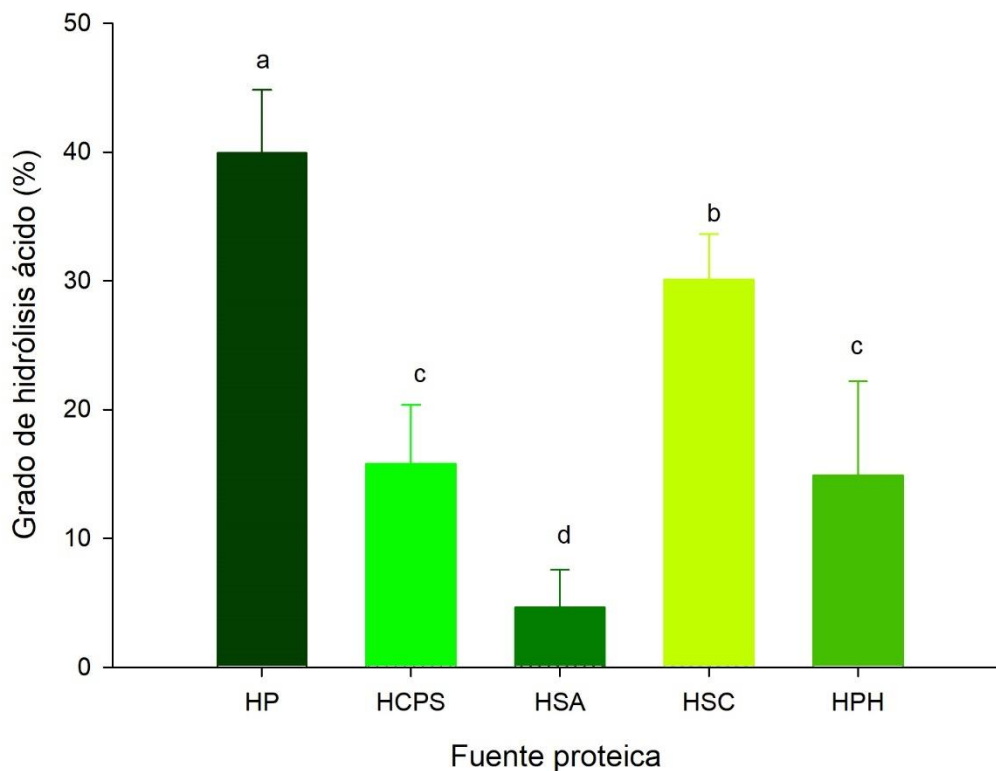


Figura 2. Grado de hidrólisis tras 15 min de digestión ácida con extracto enzimático de estómago de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*). Las fuentes proteicas se definen como; Harina de pescado (HP), Harina de concentrado proteico de soya (HCPS), Harina de subproducto de ave (HSA), Harina de carne y hueso de cerdo (HSC) y Harina de pluma hidrolizada (HPH).

En la Figura 3 se observa que la HPH fue la que presentó un mayor grado de hidrólisis con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al resto, con un  $17.90 \pm 1.94$  %, mientras que la HCPS y la HSA presentaron los valores más bajos de grados de hidrólisis, con  $5.37 \pm 2.33$  % y  $5.03 \pm 2.37$  %, respectivamente.



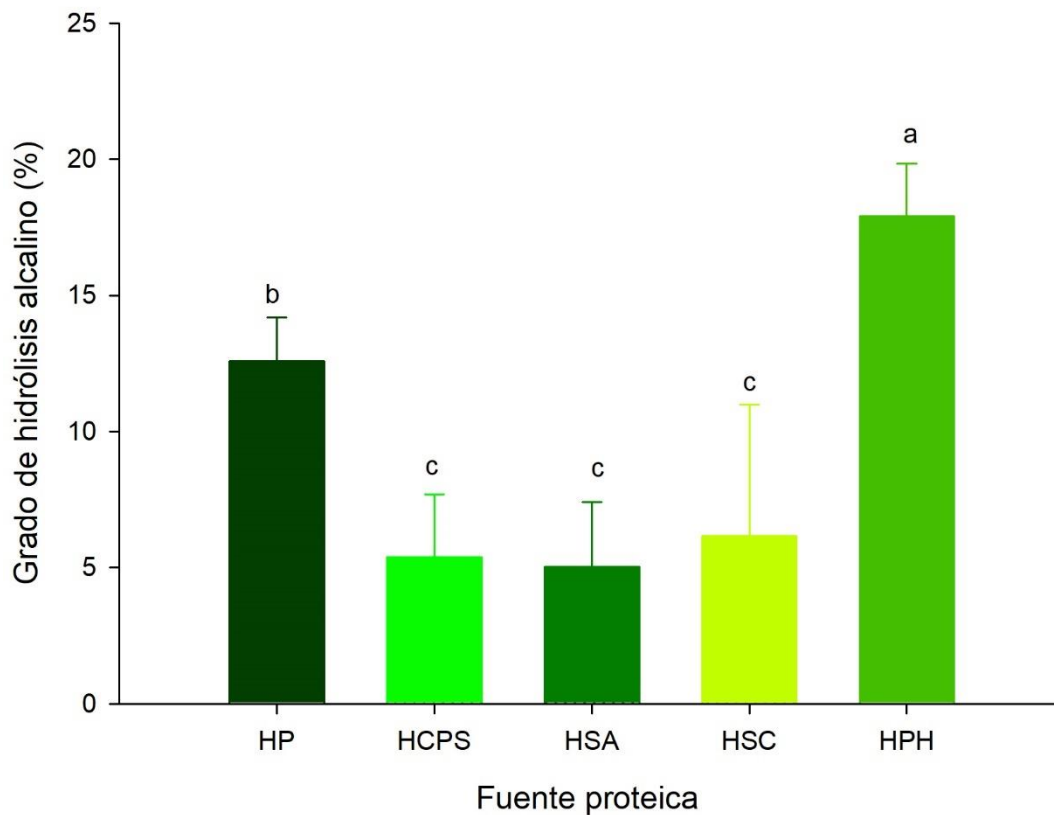


Figura 3. Grado de hidrólisis tras 45 min de digestión alcalina con extracto enzimático de páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*). Las fuentes proteicas se definen como; Harina de pescado (HP), Harina de concentrado proteico de soya (HCPS), Harina de subproducto de ave (HSA), Harina de carne y hueso de cerdo (HSC) y Harina de pluma hidrolizada (HPH).

### 7.6 Proteína soluble

La proteína soluble fue cuantificada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando para este ensayo una alícuota obtenida de cada una de las digestiones realizadas, así como de sus

respectivas réplicas. En la Figura 4 se observa que la HCPS fue la harina que presentó una mayor cantidad de proteína soluble, con  $230.3 \pm 6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de las fuentes proteicas, mientras que la HSC fue la que presentó la menor cantidad de proteína soluble, observándose  $52.6 \pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

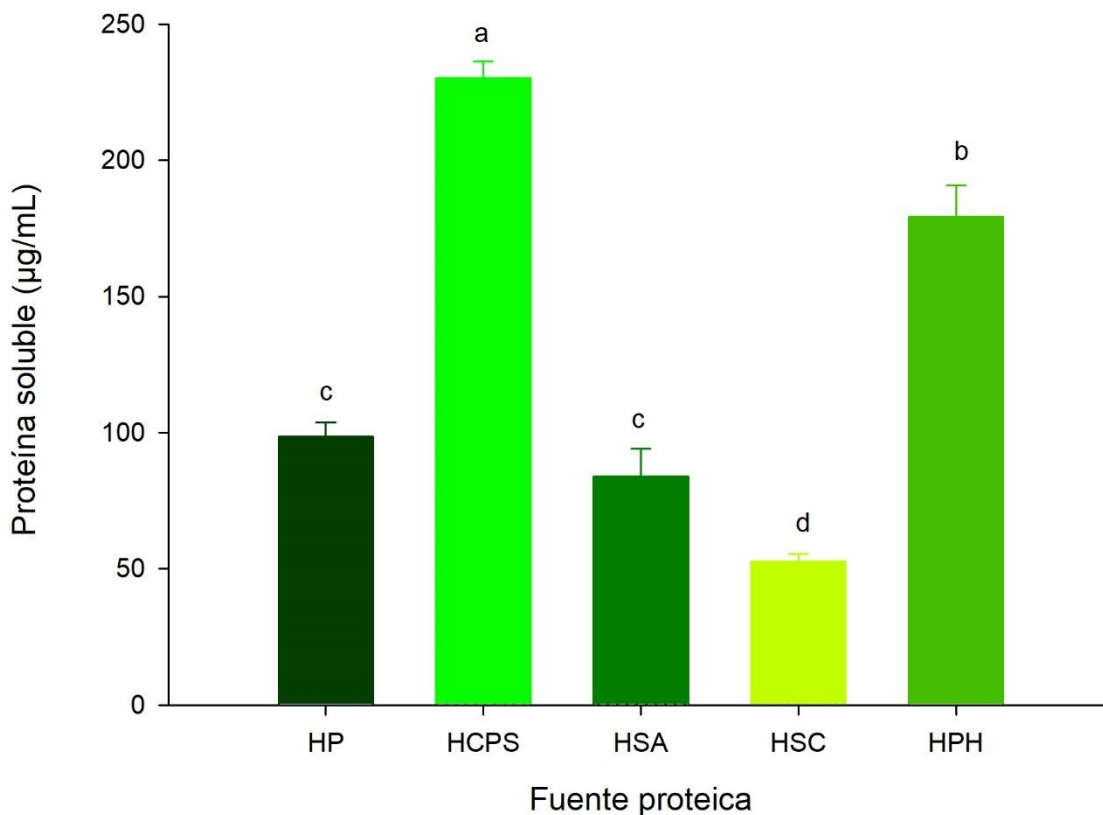


Figura 4. Contenido de proteína soluble después de digestión. Las fuentes proteicas se definen como; Harina de pescado (HP), Harina de concentrado proteico de soya (HCPS), Harina de subproducto de ave (HSA), Harina de carne y hueso de cerdo (HSC) y Harina de pluma hidrolizada (HPH).

## 7.7 Aminoácidos libres

La Tabla 4 muestra los contenidos de AAs determinados posterior a la digestión, con la finalidad de conocer la cantidad de mg de AAs libres presentes en las harinas digeridas (medido en mg AAs libres g<sup>-1</sup> de muestra). Esta tabla muestra que la HP y la HSA son los ingredientes que presentan una mayor concentración de AAs esenciales, con 6.3 ± 0.2 mg g<sup>-1</sup> para la HP y 6.1 ± 0.1 mg g<sup>-1</sup> para la HSA. Estas fuentes proteicas mostraron diferencias significativas (p<0.05) con el resto de las fuentes. La HPH presenta la menor concentración de AAs con un 2.0 ± 1.0 mg g<sup>-1</sup>, sin embargo, no presenta diferencia respecto a la HCPS y HSC.

En el caso de la arginina, la HSA y HSC fueron las harinas que presentaron una mayor concentración tras la digestión, mientras que en lo que respecta a la lisina y metionina, la HP y HSA fueron las harinas que presentaron una mayor concentración tras su digestión.

Tabla 4. Perfil de AAs libres de las fuentes proteicas después de digestión continua, hidrolizadas con extractos enzimáticos ácidos y alcalinos de estómago y páncreas de atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*).

AALs	HP (mg g <sup>-1</sup> )	HCPS (mg g <sup>-1</sup> )	HSA (mg g <sup>-1</sup> )	HSC (mg g <sup>-1</sup> )	HPH (mg g <sup>-1</sup> )
<i>AAs esenciales</i>					
HIS	1.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.2 <sup>cd</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>
ARG	1.0 ± 0.2 <sup>bc</sup>	0.8 ± 0.5 <sup>ab</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>c</sup>
THR	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.7 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	ND	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>
VAL	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>bc</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>
MET	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>
LYS	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>
ILE	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>
LEU	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup>

PHE	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>
Subtotal	6.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.2 ± 1.7 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.0 ± 1.0 <sup>b</sup>
<i>AAs no esenciales</i>					
Ácido aspártico	0.2 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>
Serina	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>
Ácido glutámico	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
Glicina	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>
Alanina	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.4 <sup>b</sup>
Tirosina	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
Subtotal	3.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.8 <sup>bc</sup>	2.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.7 <sup>c</sup>
<i>Otros</i>					
Taurina	2.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>c</sup>
Total	11.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.6 ± 2.9 <sup>bc</sup>	11.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.5 ± 2.0 <sup>c</sup>

## 7.8 Tiempo de hidrólisis ácida y alcalina

La Figura 5 y 6, muestran el tiempo y la cantidad de ácido o hidróxido de sodio necesarios para el rompimiento de enlaces peptídicos de 8mg de proteína provenientes de la HP, misma que sirvió para evaluar el tiempo necesario que se utilizará durante la hidrólisis ácida y alcalina, de las distintas fuentes proteicas. El rompimiento de enlaces peptídicos tiende a cero, indicando que por más tiempo que se quede la muestra en hidrólisis, no se conseguirá un mayor rompimiento de enlaces ni un mayor grado de hidrólisis.

Este comportamiento se ve reflejado en la Figura 5 y 6, donde las curvas pasan de tener una tendencia exponencial a una asintótica, siendo en el caso de la hidrólisis

ácida que este punto se alcanza tras 870 s (14.5 min), mientras que en la hidrólisis alcalina el tiempo requerido para alcanzar este punto es de 1,156 s (19.3 min).

El tiempo 0 indica el momento en que fue agregado el extracto enzimático a la muestra tras haber roto la capacidad buffer de la HP.

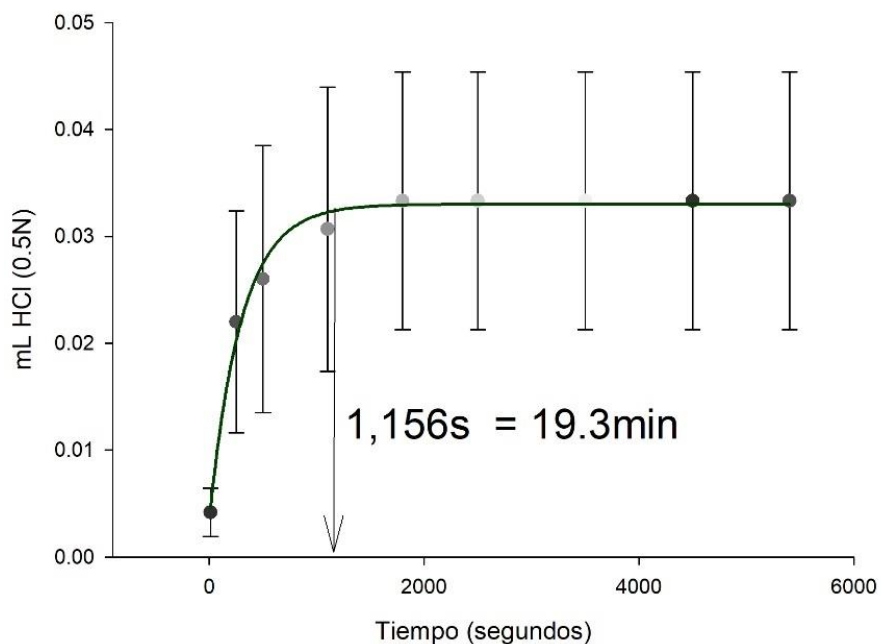


Figura 5. Tiempo de hidrólisis ácido con HP y extracto enzimático de estómago de AAP indicando en qué momento el rompimiento de enlaces peptídicos tiende a cero durante la hidrólisis ácida.

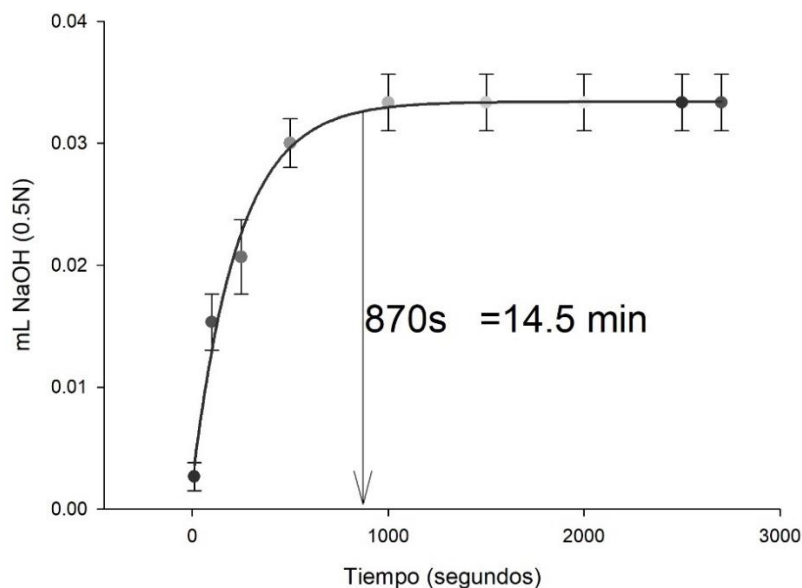


Figura 6. Tiempo de hidrólisis alcalino con HP y extracto enzimático de estómago del AAAP indicando en qué momento el rompimiento de enlaces peptídicos tiende a cero durante la hidrólisis alcalina.

## 8. Discusiones

La calidad proteica se determina de acuerdo con el contenido de aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AAAE) presentes en fuentes que contienen proteína, entre mayor sea la proporción de AAE, se determinará como una fuente de mejor calidad y, por ende, un mayor aprovechamiento por los organismos (Desai et al., 2018). En este mismo sentido, los organismos destinados a la acuicultura presentan una gran demanda de proteína con alta calidad en sus alimentos, requiriendo inclusiones de proteínas en dietas formuladas desde 24 hasta 62 % (Jannathulla et al. 2019; Hardy y Kaushiki, 2021).

Esta inclusión proteica de calidad y cantidad se obtiene comúnmente de la HP, y esto se da por las distintas características premium que presenta esta harina, tal como; su alta digestibilidad, buena palatabilidad, atrayente, algunos factores de

crecimiento aún por conocer, ausencia de factores antinutricionales, vitaminas, minerales, cantidad y calidad proteica (composición aminoacídica) y a su contenido de ácidos grasos poliinsaturados esenciales, tal como, ARA, EPA y DHA (Miles y Chapman, 2006; Cho y Kim, 2010; Olsen et al., 2012; Macusi et al., 2023).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa que la HPH fue la que presentó el mayor contenido proteico (80.7 %), seguida de HSA y HP (68.1 y 65.5 %, respectivamente). La HPH mostró un contenido mayor de AAsE (Tabla. 3) con respecto al resto de las harinas, pero no cuando es normalizado por el contenido de proteína, mostrando un contenido normalizado (NC) de 0.47 en AAsE. Esto implicaría que no cuenta con calidad aminoacídica en sus proteínas.

En este mismo sentido, se ha demostrado que la inclusión de HPH por el remplazo de HP, reduce el crecimiento en organismos carnívoros marinos (Yu et al., 2013; Ren et al., 2020), debido a su baja digestibilidad y su bajo contenido de LYS, MET y TAU; AAs que se han descrito como esenciales para las funciones fisiológicas tanto de organismos acuáticos como de terrestres (Wu, 2009; Lin et al., 2011; Salze y Davis, 2015), sobre todo para marinos carnívoros. Además, la HPH es rica en queratina, una proteína que en su estado natural tiene poco valor nutricional, y que además posee una baja digestibilidad en organismos acuáticos marinos (Poppi et al., 2011).

Los contenidos de AAsE de las harinas utilizadas en el presente estudio y su normalización por el contenido de la proteína, nos muestra la calidad aminoacídica en las fuentes proteicas, reafirmando que la HP es la fuente más rica en AAsE, seguida de la HSA (NC; Tabla 3). Estos resultados son proporcionales a lo que se ha observado en la sustitución parcial de la HP por HSA, posicionando a la HSA como un ingrediente con gran potencial en el remplazo parcial de la HP. Estas respuestas han sido observadas también en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y corvina amarilla (*Larimichthys crocea*), (Badillo-Zapata et al., 2014 y 2016; Wang et al., 2023).

La HSA ha sido utilizada de forma exitosa para reemplazar la HP hasta en un 55 % sin presentar efectos negativos en crecimiento o en el perfil de AAs de cuerpo completo, y con un coeficiente de digestibilidad aparente mayor al 79 %, esto según los resultados obtenidos por Hekmatpour y colaboradores (2018) en dietas experimentales para el perciforme *Sparidentex hasta*.

De igual forma, en el mismo trabajo presentado por Hekmatpour y colaboradores (2018), se mostró que la dieta con mayor inclusión de HSA presentó una mayor eficiencia de retención de AAs esenciales que la dieta sin inclusión, y al observar la Tabla 4 del presente trabajo se aprecia que estas dos harinas son las que presentaron el mayor contenido de AAs esenciales posterior a la hidrólisis con extractos enzimáticos de AAAP.

El reemplazo de HP con HSA también se ha probado en dietas experimentales para peces marinos carnívoros como el mero jorobado (*Cromileptes altivelis*), Shapawi y colaboradores (2007) mencionan que es posible sustituir más del 50 % de la HP con HSA en las dietas destinadas a este pez, un hecho que resulta de gran relevancia debido a que el mero jorobado, es un pez que requiere altos niveles de inclusión proteica en su dieta y que además es de lento crecimiento. Estos autores también mencionan que la razón por la que otros trabajos podrían sugerir un nivel de sustitución de HSA por HP más bajo, podría estar directamente relacionada con la calidad de los subproductos utilizados para hacer la harina examinada.

Una de las diferencias mostradas en el perfil de AAsE de la HP y HSA es el contenido de ARG, este aminoácido que se ha descrito como uno de los principales estimuladores para la hormona de crecimiento, síntesis de proteína y poliaminas en peces, tal como; híbrido de cabeza de serpiente (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂), lobina manchada (*Lateolabrax maculatus*) carpa (*Cyprinus carpio*) y mero híbrido (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) (Wan et al., 2006; Wu et al., 2018; Hoseini et al., 2019; Cheng et al., 2021; Li et al., 2022). Por



tal motivo, este elevado contenido de ARG, podría ser una de las contribuciones esenciales que ofrece la HSA y su sinergia con la HP, incrementando el crecimiento. De manera particular, esto se ha presentado en distintos organismos, tal como totoaba (*Totoaba macdonaldi*), juvenil de lobina blanca (*Morone chrysops*), juveniles de besugo negro (*Acanthopagrus schlegelii*) y juvenil de dorada (*Sparus aurata*), (Badillo-Zapata et al., 2016; Sabbagh et al., 2019; Irm et al., 2020; Rawles et al., 2022).

Otro elemento por el que la HP es ampliamente utilizada y apreciada, es por su cantidad y calidad de ácidos grasos esenciales que posee, mismos que impactan de manera positiva en la fisiología de los organismos, incrementando el crecimiento, desarrollo y reproducción de los peces, además, resulta una fuente potencial de energía metabólica, la cual parte de la oxidación de estos ácidos grasos (Tocher, 2003). En el presente trabajo, la HP fue el ingrediente que mostró la mayor cantidad de PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados), siendo superior en un 200 % en contenido en comparación con el resto de las harinas.

En particular, la HP fue la única fuente proteica en mostrar contenidos en ARA, EPA y DHA (Tabla 2), esto se le puede atribuir a la cadena trófica que se presenta en los pelágicos menores, los cuales son la materia prima para realizar la HP (Cashion et al., 2017). Los pelágicos menores como la sardina, anchoveta, macarela, entre otras, son organismos filtradores de fitoplancton y zooplancton, mismos que se han descrito como los productores primarios y que a su vez, presentan las rutas de síntesis de dichos ácidos grasos (Alder et al., 2008).

En este mismo sentido, se ha determinado que los ácidos grasos esenciales, tales como; ARA, EPA y DHA, son ampliamente necesarios para mantener un equilibrio en los procesos fisiológicos; tal como la fluidez de membrana, misma que incrementa a medida que incrementan las concentraciones de los omega-3 (EPA y DHA). También se ha descubierto que los PUFAs marinos omega-3, tienen efectos

beneficiosos contra varias enfermedades, incluyendo cardiovasculares, mentales, inflamatorias, obesidad, entre otras (Ruxton et al., 2004).

En lo que respecta a la digestibilidad *In Vitro*, el método de pH STAT es ampliamente reconocido y utilizado para evaluar la predicción de la digestibilidad proteica (grado de hidrólisis) de las distintas fuentes que se requieran incorporar a un alimento balanceado en los distintos seres vivos (Eggum et al., 1989; Dimes et al., 1994; Peña-Marin et al., 2016; Barreto et al., 2023). En los resultados obtenidos en este experimento para el grado de hidrólisis ácida (GHsAc), se observó que la HP presentó el mayor porcentaje de GHsAc, seguido de la HSC, HCPS, HPH y por último la HSA, siendo estos resultados visibles en la Figura 1. En este mismo sentido, también se ha demostrado y mencionado que la digestibilidad "*In vivo*" puede llegar a diferir drásticamente de los resultados productivos de la especie (Cuenca-Soria et al., 2013; Peña-Marin et al., 2016; Badillo-Zapata et al., 2023). Sin embargo, todavía no es entendible el porqué se difiere de lo encontrado en una digestión *In Vitro*.

Los resultados obtenidos en la digestibilidad *In vitro* de la harina de pescado (HP) y la harina de subproducto de ave (HSA) son consistentes con resultados obtenidos y reportados por Castillo-López y colaboradores (2016), quienes encontraron que la HP presentó una mayor hidrólisis en comparación con la HSA. Sin embargo, Román-Gavilanes y colaboradores (2015) reportaron que la harina concentrada de proteína de soya (HCPS) mostró un grado de hidrólisis (GHs) superior al de la HP. Según estos autores, la HCPS podría ser un mejor sustrato proteico para las enzimas, lo que podría estar relacionado con diferencias en la fuente de soya y su contenido proteico. En su estudio, utilizaron una HCPS con un 41 % de proteína cruda, mientras que en el presente trabajo se empleó un aislado proteico de soya (HCPS) con un contenido de proteína del 64 % (Tabla 1). Además, es relevante destacar que ambos estudios utilizaron pepsina porcina como fuente de enzimas ácidas y extracto pancreático de AAAP como fuente de enzimas alcalinas, asegurando así una metodología comparable para la evaluación de la digestibilidad.

Tomando este último punto, Grabner (1985); Cruz-Suárez y colaboradores (2008) y García-Gómez (2009), han ratificado que las enzimas comerciales de grado analítico son constantes en su actividad enzimática de proteasas totales (AEP), y que las enzimas obtenidas de animales terrestres (como el cerdo) no pueden usarse como base para predecir la digestión de proteína en los estudios dirigidos para digestibilidad en peces. Esto se atribuye a que los tiempos de digestión, temperaturas de activación, mecanismos de acción, rangos de pH, sensibilidad a inhibidores y otros factores, suelen ser diferentes entre especies de diferentes grados taxonómicos.

Por otro lado, la digestión ácida o el rompimiento de enlaces peptídicos que se presenta en el estómago está influenciada principalmente por la enzima pepsina, misma que rompe los enlaces en los aminoácidos terminales de PHE, TRP y TYR (Hardy y Kaushik, 2022). Sin embargo, en este trabajo no mostró una tendencia de GHsAc con respecto a los contenidos de los AAs en las fuentes proteicas. Esto pudiera deberse a las isoformas que pudieran presentarse en el AAAP, donde se han descrito cinco isoformas distintas para peces en general, tipo A, B, F, Gastricsina y Quimosina, siendo todas ellas, endopeptidasas (Oliveira et al., 2014).

De manera general se han realizado distintas investigaciones respecto a la digestibilidad *In Vitro* con organismos acuáticos, observando una gran variabilidad en los resultados obtenidos. De manera puntual, se sabe que hay variaciones entre laboratorios y técnicas, fisiología digestiva, talla, sexo, temperatura, salinidad, etc. Aunado a ello, se ha descrito a esta técnica como de aproximación para el uso de ingredientes, y que su relación con la digestibilidad *In Vivo*, puede variar drásticamente, obteniendo modelos de regresión lineal desde 0.5 hasta 0.90. Esto se ha observado en estudios realizados con pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), cíclido maya (*Cichlasoma urophthalmus*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*), (Cuenca-Soria et al., 2013; Yasumaru et al., 2014; Peña-Marin et al., 2016).

En el caso de los resultados de grado de hidrólisis alcalina (GHsAk), se observa que la HPH y la HP presentan mayores porcentajes comparados con los bajos porcentajes de las HCPS, HSA y HSC, presentando estas últimas harinas valores similares sin diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Para el caso de la HCPS, un bajo GHsAk posiblemente se deba a la presencia de factores antinutricionales propios de esta harina, tales como algunos inhibidores de tripsina y quimiotripsina, inhibidores que en un estudio realizado por Alarcón y colaboradores (1998) mostraron entre un 40-50 % de inhibición en proteasas alcalinas en dorada (*Sparus aurata*) y dentón común (*Dentex dentex*); de igual forma, estas dos enzimas suelen romper los enlaces peptídicos formados por lisina, arginina y/o fenilalanina, y según lo mencionado por Alarcón y colaboradores (2001) la HCPS es deficiente en estos AAs, y aunque en el presente trabajo la HCPS no fue el ingrediente con menor proporción de los AAs libres ya mencionados, tampoco destaca por poseer concentraciones altas respecto al resto de las harinas. Ya que en la Tabla 4 se observa que los AAs libres disminuyen hasta un 50 % comparado con la HP y HSA, un comportamiento que la HCPS también comparte con la HSC. Por tal motivo y basándonos en los grados de hidrólisis y aminoácidos libres, se sugiere no utilizar HCPS en formulaciones para AAAP.

La HPH es baja en metionina, lisina, histidina y triptófano, tal y como lo señalan Papadopoulos y colaboradores (1985), y como queda demostrado en la Tabla 3, la HPH no destaca por tener altas concentraciones de los primeros tres AA ya mencionados, siendo la harina con menor concentración de metionina y lisina. Retomando lo mencionado por Alarcón y colaboradores (2001) en el párrafo anterior, se deduce que tras la digestión de la HCPS y la HPH, no se logró tener un rompimiento de enlaces peptídicos que permitieran una alta concentración final de AAs libres; esto se ve respaldado por los resultados que se muestran en la Figura 4, donde se observa que la HCPS y la HPH fueron las harinas con mayor cantidad de proteína soluble.

Esta alta concentración de proteína soluble indica la presencia de péptidos de un tamaño mayor a los AAs libres, los cuales no terminarán siendo absorbidos por los enterocitos o su absorción será menos eficiente, dado que como lo menciona Lemme (2010), los AAs libres son absorbidos más rápidamente que aquellos que se encuentran unidos a una proteína.

Al analizar en conjunto todos los datos obtenidos tras los análisis realizados en este trabajo, los cuales incluyen proximales, GHsAc, GHsAk, proteína soluble y AAs libres, no parece haber un patrón definido o algún indicador obvio que muestre si alguna de las harinas analizadas en el presente trabajo es capaz de sustituir de forma total o parcial a la HP en la elaboración de dietas destinadas a peces marinos carnívoros. Sin embargo, haciendo un análisis más detallado se puede observar que en realidad, una de las harinas muestra potencial para sustituir al menos de forma parcial a la HP.

Los GHsAc y GHsAk nos indican la cantidad de rompimientos de enlaces peptídicos que hubo durante el proceso de digestión *In Vitro*, sin embargo, es el análisis de proteína soluble el que nos permite conocer cuántos AAs libres fueron liberados durante este proceso, siendo estos últimos los componentes que los enterocitos pueden absorber con mayor facilidad. Usando esto como base, se observa que la HCPS y la HPH presentan la mayor cantidad de proteína disuelta después de la digestión, registrando casi el doble de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína disuelta que la HP, con lo que se considera que son harinas con una baja digestibilidad.

Por otro lado, la HSC es la harina con menor concentración de proteína disuelta de todas las harinas muestreadas, no obstante, cuando se revisa la cantidad de AAs libres que presenta la HSC tras la digestión *In Vitro*, se logra apreciar que la HSC posee casi la mitad de los AAs esenciales registrados en la HP, lo que implicaría un severo déficit de AAs esenciales si se pretendiera usar la HSC como sustituto de HP.

De esta manera, se logra observar que la HSA es la única harina que presenta un potencial para sustituir a la HP en la elaboración de alimentos destinados a peces marinos carnívoros, esto debido a que presenta un perfil más balanceado que el resto de los ingredientes examinados, mostrando una cantidad de proteína similar a la HP, una concentración de PUFAs mayor a cualquier otra HSPT, y una concentración de proteína disuelta y de AAs libres que estadísticamente no varía de los resultados mostrados por la HP.

## 9. Conclusiones

- No se encontró una relación directa entre los grados de hidrólisis ácidos (GHsAc) y los grados de hidrólisis alcalinos (GHsAk), comparados con los AALs, por lo que no deben considerarse como pruebas definitivas para evaluar el aprovechamiento de las fuentes proteicas en organismos carnívoros marinos.
- La implementación de un proceso de digestión continua y la cuantificación de AALs proporcionan un entendimiento más completo sobre el aprovechamiento potencial de las fuentes proteicas, permitiendo determinar su idoneidad en alimentos formulados para peces carnívoros.
- La harina de pescado (HP) analizada demostró el mejor desempeño tanto en el GHsAc, como en el contenido de AALs. Esto confirma que la HP es una fuente proteica de alta calidad y adecuada para su uso en alimentos destinados al atún aleta azul del Pacífico (AAP).
- Por su parte, la harina de subproducto de ave (HSA), aunque no mostró altos grados de hidrólisis, logró replicar gran parte del contenido de aminoácidos libres de la HP durante la digestión continua. Esto sugiere que la HSA puede considerarse un análogo funcional de la harina de pescado (HP) y, por ende, es viable para su inclusión en dietas formuladas para el atún aleta azul del Pacífico (AAP).
- En el caso de la harina de concentrado proteico de soya (HCPS), se observó el mayor contenido de proteína soluble ( $>200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sin embargo, presentó una reducción del 50 % de AALs, lo que limita su potencial uso como fuente proteica en concentraciones elevadas para el atún aleta azul del Pacífico (AAP).
- Finalmente, aunque la harina de pluma hidrolizada (HPH) mostró un alto contenido de proteína total ( $80.7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), presentó el menor contenido de AALs tras la digestión continua. Esto la clasifica como una fuente proteica de

baja calidad, por lo que no se recomienda su uso en alimentos balanceados para el atún aleta azul del Pacífico (AAAP).

## **10.Recomendaciones**

- Incrementar 2 kg de metionina y 4 kg de lisina por cada tonelada de harina de subproducto de ave (HSA) con 68 % de proteína cuando esta se incluya en la elaboración de alimentos balanceados, con la finalidad de igualar los contenidos de AAs esenciales libres y mejorar el desempeño productivo del atún aleta azul del Pacífico.
- Enriquecer con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) los alimentos balanceados que utilicen una fuente de proteína distinta a la harina de pescado (HP), dado que no hay un ingrediente que por sí mismo iguale la cantidad de PUFAs presentes en la HP.
- Al realizar ensayos enzimáticos, utilizar extractos enzimáticos del organismo a estudiar, evitando en lo posible el uso de enzimas de grado analítico o de organismos filogenéticamente distantes.
- Evitar la inclusión de harina de pluma hidrolizada (HPH) y harina de concentrado proteico de soya (HCPS) en dietas de peces marinos carnívoros, principalmente debido a su baja digestibilidad.



## 11. Referencias

- ABCAM (s.f.). Deproteinization protocol. Recuperado de: <https://docs.abcam.com/pdf/protocols/deproteinization-protocol.pdf>
- Adler-Nissen J (1986) Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier, London, pp 427.
- Alarcón, F. J., Díaz, M., Moyano, F. J. y Abellán (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). 19(3), 257–267. doi:10.1023/a:1007717708491
- Alarcón, F., García-Carreño, F. y Navarrete del Toro, M. (2001). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. Fish Physiology and Biochemistry, 24, 179–189. <https://doi.org/10.1023/A:1014079919461>
- Alder, J., Campbell, B., Karpouzi, V., Kaschner, K. y Pauly, D. (2008). Forage fish: From ecosystems to markets. Annual Review of Environment and Resources, 33, 153–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.environ.33.020807.143204>
- Alexis, M. N., Papaparaskeva-Papoutsoglou, E. y Theochari, V. (1985). Formulation of practical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fish meal by poultry by-products and certain plant by-products. 50 (1-2), 61–73. doi:10.1016/0044-8486(85)90153-x
- Arvanitoyannis, I. S. y Kassaveti, A. (2008) Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. International Journal of Food Science and Technology, 43, 726–745. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official methods of analysis, AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 1298 pp. doi:10.1111/are.12636
- Badillo-Zapata, D., Lazo, J. P., Herzka, S. Z. y Viana, M. T. (2016). The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba*

- macdonaldi* juveniles. *Aquaculture Research*, 47 (6), 1778-1789 pp. <https://doi.org/10.1111/are.12636>
- Badillo-Zapata, D., Vega-Villasante, F., Nolasco-Soria, H., López-Acuña, L., Vargas-Ceballos, M. A., y Barreto-Curiel, F. (2023). Replacement of fishmeal by hydrolyzed feather meal in diets of juvenile *Macrobrachium tenellum* (river prawns) and its effect on muscle fatty acids. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 51 (5), 703-716 pp. doi: 10.3856/vol51-issue5-fulltext-3030
- Bañuelos-Vargas, I., López, L. M., Pérez-Jiménez, A. y Peres, H. (2014) Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 170, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.01.003>
- Barreto, A., Arena, M., Álvarez-González, A., Suárez-Bautista, J., Sánchez, A., Maldonado, C., Cuzon, G. y Gaxiola, G. (2023) Evaluation of in vitro and in vivo digestibility of potential feed ingredients for juvenile Yellowtail Snapper. *North American Journal of Aquaculture*, 86 (2), 179-192 pp. <https://doi.org/10.1002/naaq.10316>
- Barreto-Curiel, F., Focken, U., D'Abramo, L. R., Cuarón, J. A. y Viana, M. T. (2018). Use of isotopic enrichment to assess the relationship among dietary protein levels, growth and nitrogen retention in juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 495, 794-802. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.001>
- Bayliff, W.H. (1994) A review of the biology and fisheries for Northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, in the Pacific Ocean. *FAO Fisheries Technical Paper* (FAO), 336.
- Benetti, D. D., Partridge, G. J. y Stieglitz, J. (2016) *Advances in Tuna Aquaculture - Overview on Status and Technological Advances in Tuna Aquaculture Around the World*. 1-19, Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411459-3.00001-1>

- Biswas, B.K., Ji, S.-C., Biswas, A.K., Seoka, M., Kim, Y.-S., Kawasaki, K.-I. y Takii, K. (2009). Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture*, 288, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.019>
- Boyd, C. E., McNevin, A. A. y Davis, R. P. (2022) The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food Sec*, 14, 805-827. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01246-9>
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brunson, J. F, Romaire, R. P. y Reigh, R. C. (1997). Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L., 3(1), 9–16. [doi:10.1046/j.1365-2095.1997.00068.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00068.x)
- Buentello, A. (2016). Tuna Farming in Japan and Mexico. *Advances in Tuna Aquaculture*, 189–215. [doi:10.1016/b978-0-12-411459-3.00007-2](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411459-3.00007-2)
- Bureau, D. P. (2001). Utilización de harinas de origen animal en la nutrición de peces. Fats and Proteins Research Foundation, Canadian Renderers Association, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA) y Ontario Ministry of Natural Resources (OMNR). Ontario, Canadá, 1-8.
- Cashion, T., Manach, F. L., Zeller, D. y Pauly, D. (2017). Most fish destined for fishmeal production are food-grade fish. *Fish and Fisheries*, Vol. 18 (5), 837–844. <https://doi.org/10.1111/faf.12209>
- Castillo-López, E., Espinoza-Villegas, R. E. y Viana, M. T. (2016) *In vitro* digestion comparison from fish and poultry by-product meals from simulated digestive process at different times of the Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture*, 458, 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.011>
- Cheng, Y., Li, X., Wang, L., Lu, K., Song, K., Ai, Q., Mai, K. y Zhang, C. X. (2021). Effects of dietary arginine levels on growth, immune function of physical barriers and serum parameters of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*)

- reared at different water temperatures. *Aquaculture*, 541, Article 736812. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736812>
- Cho, S. H. (2010). Effect of fishmeal substitution with various animal and/or plant protein sources in the diet of the abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture Research*, 41(10):587-593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02561.x>
- Cho, J. H. y Kim, I. H. (2010). Fish meal – nutritive value. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95 (6), 685-692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Coffey, D., Dawson, K., Ferket, P. y Connolly, A. (2016) Review of the feed industry from a historical perspective and implications for its future. *Journal of Applied Animal Nutrition*, Vol 4. <https://doi.org/10.1017/jan.2015.11>
- Cuenca-Soria, C. A. Álvarez González, C. A., Ortiz-Galindo, J. L., Guerrero-Zárate, R., Perera-García, M. A., Hernández-Gómez, R. E., y Nolasco-Soria, H. (2013). Digestibilidad in vitro de ingredientes proteínicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Universidad y ciencia*, 29 (3), 263-275. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792013000300005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792013000300005&lng=es&tlng=es).
- Cruz-Suárez, E. L., Villareal-Colmenares, H., Tapia Salazar, M., Nieto-López, M. G., Villareal-Cavazos, D. A. y Ricque-Marie, D. (2008). Manual de Metodologías de Digestibilidad in vivo e in vitro para Ingredientes y Dietas para Camarón. Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 238 pp.
- Daniel, N. (2018). A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2): 164-179.
- Desai, A.S., Beibeia, T., Brennan, M.A., Guo, X., Zeng, X.A. y Brennan, C.S. (2018). Protein, amino acid, fatty acid composition, and in vitro digestibility of bread fortified with *Oncorhynchus tshawytscha* powder. *Nutrients*, 10, 1923. <https://doi.org/10.3390/nu10121923>
- Dimes, L. E., Haard, N. F., Dong, F. M., Rasco, B. A., Forster, I. P., Fairgrieve, W. T., Arndt, R., Hardy, R. W., Barrows, F. T. y Higgs D. A. (1994) Estimation of protein digestibility—II. In vitro assay of protein in salmonid feeds. *Comp*

- Biochem Physiol, 108 (2-3), 363-370. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90107-4)
- Eggum, B. O., Hansen, I. y Larsen T. (1989) Protein quality and digestibility energy of selected food determined in balance trials with rats. *Plants Foods Human Nutr* 39, 13-21. <https://doi.org/10.1007/BF01092397>
- FAO (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Folch, J., Lee, M., y Stanley, G. (1957). A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Foreman, T.J. e Ishizuka, Y. (1990) Giant bluefin off southern California, with a new California size record. *Calif. Fish Game*, 76, 181-186.
- Fuentes-Quesada, J. P., Viana, M. T., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Called, V., Lazo, J. P. y 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.025>
- García-Gómez, F. Y. (2009). Evaluación de fuentes proteicas por medio de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para la elaboración de dietas de juveniles de jurel, *Seriola lalandi dorsalis*. (Tesis de maestría) Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Recuperado de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1168>
- Glencross, B. D., Booth, M., y Allan, G. L. (2007). A feed is only as good as its ingredients – A review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition*, 13 (1), 17–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x>
- Grabner, M. (1985). An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture*, 48 (2), 97-110. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90097-3)

- Guerrero-Zarate- R., Olvera-Novoa, M. A., Jesús-Contreras. R., Frías-Quintana, C. A., Martínez-García, R. y Álvarez-González, C. A. (2024) Evaluation of protein and lipid ingredients through in vitro digestibility for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, 52, 47-58. <http://dx.doi.org/10.3856/vol52-issue1-fulltext-3037>
- Hardy, R. W. y Kaushik, S. J. (2021) *Fish Nutrition*. Cuarta edición. 922 pp.
- Hekmatpour, F., Kochanian, P., Marammazi, J. G., Zakeri, M. y Seyed-Mohammad, M. (2018) Inclusion of poultry by-product meal in the diet of *Sparidentex hasta*: Effects on production performance, digestibility and nutrient retention. *Animal Feed Science and Technology*, 241, 173-183. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.02.010>
- Hoseini, S. M., Yousefi, M., Hoseinifar, S. H. y Doan. H. V. (2019). Effects of dietary arginine supplementation on growth, biochemical, and immunological responses of common carp (*Cyprinus carpio L.*), stressed by stocking density. *Aquaculture*, 503, 452-459. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.031>
- Irm, M., Taj, S., Jin, M., Luo, J., Andriamialinirina, H.J.T. y Zhou, Q. (2020). Effects of replacement of fish meal by poultry by-product meal on growth performance and gene expression involved in protein metabolism for juvenile black sea bream (*Acanthoparus schlegelii*). *Aquaculture*, Vol 528, Article 735544. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735544>
- Jannathulla, R.; Rajaram, V.; Kalanjiam, R.; Ambasankar, K.; Muralidhar, M. y Daval, J. (2019). Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquac Res*, 50 (12), 3493–3506 <https://doi.org/10.1111/are.14324>
- Ji, S.-C., Takaoka, O., Biswas, A.K., Seoka, M., Ozaki, K., Kohbara, J., Ukawa, M., Shimeno, S., Hosokawa, H. y Takii, K., (2008). Dietary utility of enzyme-treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish. Sci.* 74, 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01475.x>

- Jobling, M. (2001). Nutrient partitioning and the influence of feed composition on body composition. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), *Food Intake in Fish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 354–375. doi:10.1002/9780470999516
- Kondo, F., Iwai, T., Miura, C., Sakata, J., Ohta, T., Ido, A., Irie, S., Okamatsu, K., Kakumasa, K., y Miura, T. (2016). Analysis of feeding effects of EP on growth and digestion in cultured bluefin tuna. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 82 (6), 923-933 <https://doi.org/10.2331/suisan.16-00030>
- Kureshy, N., Allen-Davis, D. y Arnold, C. R. (2000). Partial Replacement of Fish Meal with Meat-and-Bone Meal, Flash-Dried Poultry By-Product Meal, and Enzyme-Digested Poultry By-Product Meal in Practical Diets for Juvenile Red Drum, *North American Journal of Aquaculture*, 62 (4), 266-272, doi: [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062%3C0266:PROFMW%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062%3C0266:PROFMW%3E2.0.CO;2)
- Llanes-Iglesias, J. E. y Toledo Pérez, J. (2015) Concentrado cárnico para postlarvas de tilapias del nilo GIFT (*Oreochromis niloticus*) *Multiciencias*. 15 (4), 383-388.
- Lemme, A. (2010). Availability and effectiveness of free amino acids in aquaculture. *Avances En Nutrición Acuicola*. Recuperado a partir de <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/109>
- Li, P., Hou, D., Zhao, H., Peng, K., Chen, B., Guo, H. y Cao, J. (2022). Effects of dietary arginine levels on intestinal morphology, digestive enzyme activity, antioxidant capacity and intestinal flora of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) *Aquacult. Rep.*, 25 (2022), Article 101244. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101244>
- Lin, S. y Luo, L. (2011). Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, 168: 80-87. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.03.012.

- López, L. M., Flores-Ibarra, M., Bañuelos-Vargas, I., Galaviz, M. A. y True, C. D. (2015). Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiol Biochem*, 41, 921–936. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0058-5>
- Macusi, E.D.; Cayacay, M.A.; Borazon, E.Q.; Sales, A.C.; Habib, A.; Fadli, N. y Santos, M.D. (2023). Protein Fishmeal Replacement in Aquaculture: A Systematic Review and Implications on Growth and Adoption Viability. *Sustainability*, 15 (16), 12500. <https://doi.org/10.3390/su151612500>
- Majkowski, J. (2007). Global fishery resources of tuna and tuna-like species (Vol. 483). Food & Agriculture Org.
- Matus de la Parra, A., Rosas, A., Lazo, J. P. y Viana, M. T. (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 223-231. doi 10.1007/s10695-007-9134-9
- Masuma, S., Takebe, T. y Sakakura. Y. (2011). A review of the broodstock management and larviculture of the Pacific northern bluefin tuna in Japan. *Aquaculture*, 315, pp. 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.030>
- Mateo, A., Soto, F., Villarejo, J.A. y Fernández, C. (2007). Automatic Inspection System for Quality Evaluation of Fresh Tuna Meat. 2007 IEEE International Symposium on Industrial Electronics. 1669–1674. doi:10.1109/isie.2007.4374855
- Mendoza, A., De Dios, C., Vazquez, E., Cruz, D., Ricque, C., Aguilera, J. y Montemayor, A. (2001). Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 7(3):143 – 151. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2001.00164.x>
- Miles R. D., Chapman F. A. (2006). The benefits of fish meal in aquaculture diets. Series of the Department of Fisheries and Aquatic Sciences University of Florida. FA. 122:7-8



- Millamena, O. M. (2002). Replacement of fish meal by animal by-product meals in a practical diet for grow-out culture of grouper *Epinephelus coioides*. , 204 (1-2), 0–84. doi:10.1016/s0044-8486(01)00629-9
- Minjarez-Osorio, C., Castillo-Alvarado, S., Gatlin, D. M., González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M. y Rossi, W. (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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.042>
- Mirzakhani, M. K., Kenari, A. A. y Motamedzadegan, A. (2018) Prediction of apparent protein digestibility by in vitro pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt 1869). *Aquaculture*, 496, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.014>
- Murashita, K., Hashimoto, H., Takashi, T., Eba, T., Kumon, K., Matsunari, H. y Yamamoto, T. (2021). Characterization of digestive physiology in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juveniles fed a raw fish feed and a commercial diet. *Aquaculture*, 538, 736562. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.736
- Murray, S. M., Patil, A. R., Fahey, G. C., Merchen, N. R. y Hughes, D. M. (1997). Raw and rendered animal by-products as ingredients in dog diets. *Journal of Animal Science*, 75 (9). 2497-2505. <https://doi.org/10.2527/1997.7592497x>
- Neilson, J. D. y Campana, S. E. (2008) A validated description of age and growth of western Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65 (8), 1523-1527. <https://doi.org/10.1139/F08-127>
- Nengas, I., Alexis, M. N. y Davies, J. S. (1999). High inclusion levels of poultry meals and related byproducts in diets for gilthead seabream *Sparus aurata* L., *Aquaculture*, 179 (1-4), 0–23. doi:10.1016/s0044-8486(99)00148-9
- Nguyen, T. N., Davis, D. A. y Saoud, I. P. (2009). Evaluation of Alternative Protein Sources to Replace Fish Meal in Practical Diets for Juvenile Tilapia, *Oreochromis spp.* *Journal of the World Aquaculture Society*, 40 (1), 113-121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00230.x>

- Nolasco-Soria, H. (2020). Improving and standardizing protocols for alkaline protease quantification in fish. *Reviews in Aquaculture*, 1-23 <https://doi.org/10.1111/raq.12463>
- Nolasco-Soria, H., Nolasco-Alzaga, H., y Gisbert, E. (2020). The importance of pepsin-like acid protease quantification in aquaculture studies: a revision of available procedures and presentation of a new protocol for its assessment. *Reviews in Aquaculture*, 1-16. doi:10.1111/raq.12417
- Oliveira, V. M., Bezerra, R. S. y Assis, C. R. D. (2014) Fish pepsin: basic characteristics, extraction, determination and biotechnological applications. *Natural Resources*, 4, 6-14. <https://doi.org/10.6008/SPC2237-9290.2014.001.0001>
- Olsen, R. L. y Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.003>
- Papadopoulos, M. C., El Boushy A. R. y Ketelaars, E. H. (1985). Effect of Different Processing Conditions on Amino Acid Digestibility of Feather Meal Determined by Chicken Assay. *Poultry Science*, 64 (9), 1729–1741. <https://doi.org/10.3382/ps.0641729>
- Parrish, C. C., Nichols, P. D., Pethybridge, H. y Young, J. W. (2014) Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia*, 177, 85-95. doi.org/10.1007/s00442-014-3131-3
- Pauly, D., Christensen, V., Guénette, S., Pitcher, T. J., Sumaila, U. R., Walters, C. J., Watson, R. y Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *418 (6898)*, 689-695. <https://doi.org/10.1038/nature01017>
- Peña, E., Hernández, C., Ibarra-Castro, L., y Álvarez-González, C. A. (2017). In vitro protein digestibility of different grow-out stages of Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*, Steindachner, 1869). *Aquaculture Nutrition*, 23 (6), 1204–1215. <https://doi.org/10.1111/anu.12489>
- Peña-Marín, E. S. (2016). Estudio de la capacidad digestiva proteica en la ontogenia juvenil del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. (Tesis de doctorado). Centro de

- Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Recuperado de:  
<https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/125>
- Poppi, D. A. Quinton, V. M., Hua, K. y Bureau, D. P. (2011). Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 314 (1-4), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.016>
- Poot-López, G.R., Hernández, J.M. y Gasca-Leyva, E. (2010). Input management in integrated agriculture aquaculture systems in Yucatan: tree spinach leaves as a dietary supplement in tilapia culture. *Agricultural Systems*, 103, 98-104 <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2009.11.003>
- Rawles S. D., Fuller, A., Green, B. W., Abernathy, J. W., Straus, D. L., Deshotel, M. B., McEntire, M. E., Huskey, G., Rosentrater, K. A., Beck, B. H. y Webster, C. D. (2022). Growth, body composition, and survival of juvenile white bass (*Morone chrysops*) when dietary fish meal is partially or totally replaced by soybean meal, poultry by-product meal, an all-plant protein blend or a commercial plant-animal protein blend. *Aquaculture Reports*, Vol. 26, Article 101307. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101307>
- Ren, X., Huang, D., Wu, Y. B., Jiang, D. L., Li, P., Chen, J. M, y Wang, Y. (2020). Gamma ray irradiation improves feather meal as a fish meal alternate in largemouth bass *Micropterus salmoides* diet. *Animal Feed Science and Technology*, 269, 114647. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114647>
- Román-Gavilanes, A. I., Martínez-Montaño, E. y Viana M. T. (2015). Comparative Characterization of Enzymatic Digestion from Fish and Soybean Meal from Simulated Digestive Process of Pacific Bluefin Tuna, *Thunnus orientalis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46 (4). doi: 10.1111/jwas.12204
- Ruxton C. S. H., Reed S. C., Simpson M. J. A. y Millington K. J. (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acid: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*, 17 (5), 449–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x>
- Sabbagh, M., Schiavone, R., Brizzi, G., Sicuro, B., Zilli, L. y Vilella, S. (2019). Poultry by-product meal as an alternative to fish meal in the juvenile gilthead

- seabream (*Sparus aurata*) diet. *Aquaculture*, Vol. 511, Article 734220. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734220>
- Salze, G. P. y Davis, D. A. (2015). Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture*, 437, 215-229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.006>
- Sarà, G. y Sarà, R. (2007). Feeding habits and trophic levels of bluefin tuna *Thunnus thynnus* of different size classes in the Mediterranean Sea. *J. Appl. Ichthyol*, 23, 122-127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00829.x>
- Shapawi, R., Wing-Keong, N. y Mustafa, S. (2007) Replacement of fish meal with poultry by-product meal in diets formulated for the humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*, 273, 118-126 pp. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.014>
- Shepherd, C. J., y Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology*. doi:10.1111/jfb.12224
- Shimose, T., Tanane, T., Kuo-Shu, C. y Chien-Chung, H. (2009) Age determination and growth of Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, off Japan and Taiwan. *Fisheries Research*, 100 (2), 0-139. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.06.016>
- Silva, A., Escalante, K., Alvarez-González, C., Guerrero-Olazarán, M., y Gaxiola, G. (2014). Testing protein digestibility in Red Grouper *Epinephelus morio* using in vitro and in vivo methods. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 64, 1069–1081. <https://doi.org/10.46989/001c.20764>
- Steffens, W. (1994). Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. 124 (1-4), 0–34. doi: 10.1016/0044-8486(94)90351-4
- Tacon, A. y Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285 (1-4), 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>

- Tacon, A. y Metian, M. (2009). Fishing for Feed or Fishing for Food: Increasing Global Competition for Small Pelagic Forage. *Fish Reviews in Fisheries Science*, 17 (3), 305-317. <https://doi.org/10.1080/10641260802677074>
- Tidwell, J. H., Webster, C. D., Yancey, D. H. y D'Abramo, L. R. (1993). Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and distillers' by-products in diets for pond culture of the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), 118 (1-2), 0–130. doi:10.1016/0044-8486(93)90285-7
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11 (2), 107-184. doi:10.1080/713610925
- Toledo, J., Llanes, J. E. y Romero, C. (2014). Sustitución de la harina de pescado por harina de subproductos de aves en la alimentación de alevines de tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista cubana de investigaciones pesqueras*, 31 (1), 22-24 pp.
- Valente, M.P.L., Cabral, E. M., Sousa, V., Cunha, L. M. y Fernandes, J. M. O. (2016). Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. *Aquaculture*, 453, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.034>
- Wang, X., Luo, H., Zheng, Y., Wang, D., Wang, Y., Zhang, W., Chen, Z., Chen, X. y Shao, J. (2023) Effects of poultry by-product meal replacing fish meal on growth performance, feed utilization, intestinal morphology and microbiota communities in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture Reports*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101547>
- Wan, J. L., Mai, K, S. y Ai Q. H. (2006). The recent advance on arginine nutritional physiology in fish. *J. Fish. Sci. China*, 13: 679-685. doi:10.3321/j.issn: 1005-8737- (2006) 04-0679-07.
- Wang, Y., Wang, L., Zhang, C.X. y Song, K. (2017). Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Reports*, 5, 52-57. doi: 10.1016/j.aqrep. 2016.12.005.

- Wang, H., Wang, Y., Wang, Q., Xue, C. y Sum, M. (2006). Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.), 32 (2), 179–188. doi:10.1007/s10695-006-0010-9
- Wu, G. Y. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Wu, Y., Wang, Yan., Ren, X., Huang, D., Si, G. y Chen, J. (2021). Replacement of fish meal with gamma-ray irradiated soybean meal in the diets of largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Nutrition*, 0. 1–9. <https://doi.org/10.1111/anu.13239>
- Wu, M., Wu, X., Lu, S., Gao, Y., Yao, W., Li, X., Dong, Y. y Jin, Z.B. (2018). Dietary arginine affects growth, gut morphology, oxidation resistance and immunity of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) juveniles *Br. J. Nutr.*, 120 (3), 269-282. 2018;120(3):269-282. doi:10.1017/
- Yasumaru, F. y Lemos, D. (2014) Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 426-427, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.012>
- Ye, H., Xu, M., Liu, Q., Sun, Z., Zou, C. y Chen, L. (2019). Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth performance, feed utilization and physiological status of juvenile obscure puffer, *Takifugu obscurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 216, 75-81. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.11.006.
- Yu, H. R., Zhang, Q., Cao H., Wang, X. Z., Huang, G. Q., Zhang, B. R. y Cui, Y. (2013). Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for juvenile snakehead, *Ophiocephalus argus*. *Aquacult. Nutr.*, 19 (2), 139-147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00947.x>
- Yun, B., Xue, M., Wang, J., Sheng, H., Zheng, Y. y Wu, X. (2014). Fishmeal can be totally replaced by plant protein blend at two protein levels in diets of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt. *Aquaculture nutrition*, 20 (1), 69-78. <https://doi.org/10.1111/anu.12053>

Zhang, Y., Øverland, M., Shearer, K.D., Sørensen, M., Mydland, L.T. y Storebakken, T. (2012). Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *Aquaculture*, 360, 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.003>