



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA**



**Efecto de la inclusión de subproductos
de origen vegetal y animal en la
digestibilidad, actividad enzimática y
expresión de genes en tilapia
(*Oreochromis niloticus*).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

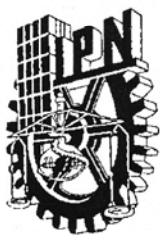
DOCTORADO EN

CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MAGNOLIA MONTOYA MEJÍA

GUASAVE, SINALOA; MÉXICO. DICIEMBRE 2016.

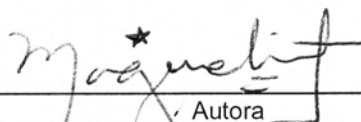


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

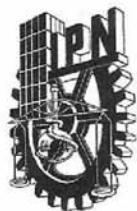
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Guasave, Sinaloa. El día 10 de noviembre del año 2016, la que suscribe: Magnolia Montoya Mejía alumna del programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A130416, adscrita al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de los doctores: Hervey Rodríguez González y Ana María Sifuentes Rincón y cede los derechos del trabajo titulado: "Efecto de la inclusión de subproductos de origen vegetal y animal en la digestibilidad, actividad enzimática y expresión de genes en tilapia (*Oreochromis niloticus*)" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, graficas o datos del trabajo sin autorización de la autora o directores del trabajo. Para puede ser solicitado escribiendo a las siguientes direcciones: m_magnolia@hotmail.com; hrodriguezg@ipn.mx; asifuentes@ipn.mx. De ser otorgado, deberá citar correctamente el mismo.



Autora
Magnolia Montoya Mejía



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 18 de Mayo del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA en su sesión ORDINARIA No. 4 celebrada el día 17 del mes de Abril conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

MONTOYA

Apellido paterno

MEJÍA

Apellido materno

MAGNOLIA

Nombre (s)

Con registro:

A	1	3	0	4	1	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

“Efecto de la inclusión de subproductos de origen vegetal y animal en la digestibilidad, actividad enzimática y expresión de genes en tilapia (*Oreochromis niloticus*)”

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

*Caracterización del sistema digestivo de la tilapia *Oreochromis niloticus*

*Digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de diferentes subproductos de origen vegetal y animal

*Determinación del efecto de los subproductos alimentarios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Hervey Rodríguez González y Dra. Ana María Sifuentes Rincón

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CIIDIR-SIN.; CBG Reynosa, Tamps. y CIBNOR, La Paz, BCS.

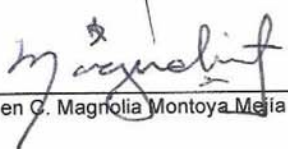
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.


4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis



Dr. Hervey Rodríguez González

Aspirante


M. en C. Magnolia Montoya Mejía

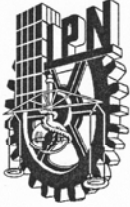

Dra. Ana María Sifuentes Rincón

Presidente del Colegio


Dra. Diana Cecilia Escobedo Urías



CIIDIR IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave siendo las 12 horas del día 17 del mes de noviembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

"Efecto de la inclusión de subproductos de origen vegetal y animal en la digestibilidad, actividad enzimática y expresión de genes en tilapia (*Oreochromis niloticus*)"

Presentada por la alumna:

<u>Montoya</u>	<u>Mejía</u>	<u>Magnolia</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con-registro: <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>A</td><td>1</td><td>3</td><td>0</td><td>4</td><td>1</td><td>6</td> </tr> </table>			A	1	3	0	4	1	6
A	1	3	0	4	1	6			

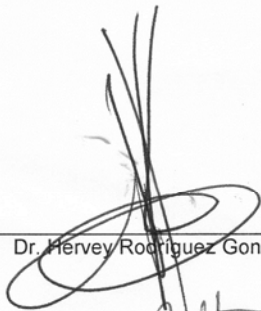
aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

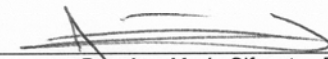
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

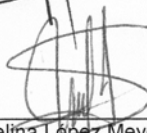
Directores de tesis



 Dr. Hervey Rodríguez González




 Dra. Ana María Sifuentes Rincón



 Dra. Melina López Meyer

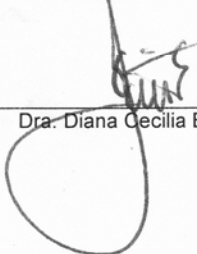


 Dra. Claudia Castro Martínez



 Dr. Héctor Nolasco Soria

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



 Dra. Diana Cecilia Escobedo Urías



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Acuacultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El presente trabajo fue apoyado económicamente a través del Programa Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por los proyectos financiados por la Secretaría de Investigación y Posgrado con número de registro: SIP20131517, SIP20141467, SIP20150267 y SIP20160482. La alumna Magnolia Montoya Mejía fue apoyada con una beca CONACYT con clave 244192 y por la Coordinación de Cooperación Académica (CCA) del IPN con beca de movilidad.

Mi inspiración:

Jesús Javier y María Renne

Dedicada a:

Rosa Amelia Mejía

"Mas aún, quien con espíritu humilde y ánimo constante se esfuerza por escrutar lo escondido de las cosas, aún sin saberlo, está como guiado por la mano de Dios, que, sosteniendo todas las cosas, hace que sean lo que son."

Gaudium et spes

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Sinaloa, al personal docente y de apoyo por las facilidades prestadas durante mi estancia como alumna de esta institución.

A mis directores de tesis, Dr. Hervey Rodríguez González y Dra. Ana María Sifuentes Rincón, por aceptarme como alumna y brindarme su apoyo incondicional mediante orientación y proporcionándome las herramientas para la realización de cada parte del proyecto. Mostrarme que la perseverancia era la clave para lograr esta meta y sacar lo mejor de mí, siempre ir por más.

Al Dr. Héctor Nolasco por aceptar ser parte de mi comité tutorial, abrirme las puertas de su laboratorio, permitirme ser su colaboradora y aprender de él. Por el tiempo que siempre ha dedicado para apoyarme en la realización de mi trabajo, por su paciencia y por sus lecciones. Siempre ha sido un reto para mí, trabajar bajo sus expectativas. Me motiva a ser la mejor en lo que decida ser, hacer las cosas bien hechas y lograr lo que me proponga.

A la Dra. Melina López Meyer, por brindarme su apoyo incondicional y paciencia al enseñarme, por su amabilidad, su calidez, por permitirme realizar trabajo analítico en su laboratorio y brindarme todas las herramientas necesarias para obtener el máximo provecho. Por el tiempo de enseñanza que me dedicó y por su guía.

A la Dra. Claudia Castro por apoyarme, sus comentarios, correcciones y colaboración para este trabajo fueron de gran ayuda.

Al Dr. Manuel García Ulloa, por su orientación y colaboración en la realización de los bioensayos experimentales, apoyo en escritura de artículos, por su tiempo y siempre amabilidad y disposición para realizar todo de manera “urgente”.

Al Dr. Roberto Gutiérrez, por permitirme procesar en su laboratorio, todos los ingredientes y alimentos experimentales.

A la Dra. Julieta Espinoza por siempre bríndame el apoyo y una excelente asesoría para realizar los alimentos en el laboratorio de UAS Culiacán asimismo por su paciencia, tiempo y amistad.

Al Dr. Miguel Ángel Reyes, por apoyarme incondicionalmente durante mi estancia en CBG-Reynosa.

A la cDra. Lorena Vázquez Montoya, por su apoyo y amor incondicional, por ser mucho más que mi compañera de carrera, por ser mi aliada, orientadora, ayudante, por cada momento compartido, por su tiempo y amistad.

Al personal técnico del CIIDIR-SIN que colaboraron en este trabajo; especialmente a Nadia Vázquez Montoya, Claudia María Ramírez Douriet, M.C. Alicia Fierro Coronado. Al personal de mantenimiento, en especial a Vicente, José y Régulo; a los guardias de seguridad por su contribución en las actividades donde fue solicitado su apoyo y también por resguardar nuestra seguridad las ocasiones que permanecemos toda la noche en el centro.

Al personal técnico del CIBNOR, que colaboraron en este trabajo; especialmente a la M.C. Patricia Hinojosa Baltazar, M.C. Manuel Salvador Trasviña Castro, IBQ. Myriam Lizzeth Hernández De Haro, Roberto Hernández Herrera, Sonia Guadalupe Rocha, a cada uno, por su apoyo para la realización de cada una de las técnicas realizadas en esta institución. A Ira Fogel, por su apoyo en la edición de los productos de investigación.

Al personal técnico del laboratorio de Biotecnología Animal del CBG, por el apoyo brindado durante mi estancia de capacitación.

A mis alumn@s:

Tesistas: Jorge Luis García Mejía, Carely Guadalupe Delgado Lugo e Itzel Isamar Sepúlveda Acuña

Servicio social: Eliza, Yaneli, Adriana, Kariel, Alejandra, Fernanda, Johana, Alexandra y Sarai.

A mis compañeros de laboratorio: Martín Roberto y José Pedro por apoyarme siempre que necesité su ayuda.

A mis hermanos, Amelia y Carlos Francisco, por siempre creer en mí, al final eso me invita a lograr cada meta que me propongo.

A mi padre, Francisco Javier Montoya Barnoin, por ser tan consentidor, proveedor, al final de cuentas, por permitirme ser su princesa y sembrar en mí el amor al trabajo, por su esfuerzo y sus manos duras.

A mi madre, Rosa Amelia Mejía, quien es mi principal pilar en todas mis acciones y le debo todo lo que soy, por apoyarme y guiarme para la realización de mi doctorado.

A mi esposo, Alejandro Valladares Audelo, por haber llegado a mi vida, hacerme sentir admirada, aceptada y por motivarme a conquistar cada sueño anhelado. Por creer en mi y apoyarme sin medida.

A mis hijos, Jesus Javier y Maria Renne, por el tiempo que les robé para dedicar de manera exclusiva a la realización de este proyecto y el cual compensó siempre que me es posible. Agradezco su paciencia y amor incondicional.

Por último, agradezco a cada una de las personal que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de este proyecto. A cada uno de mis familiares y amistades. Por ser parte de mi vida, triunfos y derrotas. Todas y cada una de ellas transforman mi vida y dejan una lección. Debo lo que soy a cada experiencia vivida. Gracias a la vida por permitirme existir y a Dios mi siempre aliado y mayor amado.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

Montoya–Mejía M., Rodríguez–González H., Nolasco–Soria H. 2016. Circadian cycle of digestive enzyme production at fasting and feeding conditions in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Perciformes: Cichlidae). *Acta Ichthyol. Piscat.* 46 (3): 163–170. DOI: 10.3750/AIP2016.46.3.01

Montoya–Mejía M., García–Ulloa M., Hernandez–Llamas A., Nolasco–Soria H., Rodríguez–González H. 0000. Digestibility, growth, blood chemistry and enzyme activity of juvenile *Oreochromis niloticus* fed isocaloric diets containing animal and plant by–products. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 00 (0): 00–00. En revisión.

Montoya–Mejía M., Rodríguez–González H., Nolasco–Soria H. 0000. *In vitro* digestibility of feed by–products ingredients with potential for tilapia aquaculture. *Journal of Animal and Plant Sciences.* 00 (0): 00–00. En revisión.

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

XII International Symposium of Aquaculture Nutrition. 2013. Uso de sub–productos agroindustriales (garbanzo y frijol quebrado) y maíz de alta calidad proteica en dietas para tilapia, digestibilidad *in vivo*. División Académica de Ciencias Biológicas (Universidad Juárez Autónoma de Tabasco) del 20–22 de noviembre en Villahermosa, Tabasco.

9th International Aquaculture Forum & LACQUA 14. Ciclo circadiano de la producción de enzimas digestivas en tilapia *Oreochromis niloticus*. Del 5–7 noviembre, Guadalajara, México.

FENACAM 2015 & LACQUA 2015. Circadian cycle of digestive enzyme production at basal conditions and stimulated with feed in tilapia *Oreochromis niloticus*. International Conference & Exposition, Fortaleza, Brasil, 16–19 noviembre.

FENACAM 2015 & LACQUA 2015. Used of fermented and dehulled common bean *Phaseolus vulgaris* meal in diets for nile tilapia *Oreochromis niloticus*: *In vivo* digestibility and anti–nutritional factors. International Conference & Exposition, Fortaleza, Brasil, 16–19 noviembre.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Laboratorio de Fisiología comparada. 1. Estudios del ciclo circadiano de enzimas digestivas en la tilapia. 2 Estudio de los niveles de enzimas digestivas en la tilapia en función de los tratamientos alimenticios. 3. Estudios de digestibilidad *in vitro* de ingredientes y alimentos por la tilapia. Estancia dirigida por Dr. Héctor Nolasco Soria, Investigador Titular C.

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Hervey Rodríguez González
Co-director
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional

Dra. Ana María Sifuentes Rincón
Co-director
Centro de Biotecnología Genómica

Dr. Héctor Nolasco Soria
Co-tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dra. Melina López Meyer
Co-tutor
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional

Dra. Claudia Castro Martínez
Co-tutor
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional

Comité revisor de tesis

Dr. Hervey Rodríguez González
Dra. Ana María Sifuentes Rincón
Dr. Héctor Nolasco Soria
Dra. Melina López Meyer
Dra. Claudia Castro Martínez

Jurado de examen

Dr. Hervey Rodríguez González
Dra. Ana María Sifuentes Rincón
Dr. Héctor Nolasco Soria
Dra. Melina López Meyer
Dra. Claudia Castro Martínez

Suplentes

Dr. Manuel García Ulloa

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la inclusión de subproductos agroindustriales de origen animal; [(FS) ensilado de desechos de pescado, (BB) sangre de bovino, (WH) suero lácteo y (RC) harina de langostilla] y de origen vegetal; [(CH) garbanzo, (EC) garbanzo extruido, (EB) frijol extruido, (CM) pasta de coco y (JM) pasta de *Jatropha curcas*] en la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, actividad enzimática digestiva, estado nutricional y expresión génica en tilapia *O. niloticus*. Para evaluar la digestibilidad *in vitro*, se determinaron los horarios de mayor actividad enzimática digestiva de la tilapia, mediante la determinación del ciclo circadiano, en condiciones de ayuno y con estímulo alimenticio, de pepsina, proteasas alcalinas, amilasas y lipasas. Los resultados mostraron una producción enzimática regulada por el fotoperiodo, con mayor actividad enzimática en horarios nocturnos y un aumento en la actividad por la ingesta de alimentos. Al azar, del estanque de cultivo, se tomaron tilapias en un lapso de tiempo entre las 19:00 y 23:00 h (horario de elevada actividad enzimática), para su disección y la obtención del sistema digestivo, con el fin de preparar los extractos enzimáticos para la determinación de la digestibilidad *in vitro*, en fase ácida con el extracto de estómago (pepsina) y posteriormente en fase alcalina con el extracto multienzimático intestinal (proteasas alcalinas). Todas las dietas que incluyeron el 30% de subproducto animal o vegetal, tuvieron una mayor digestibilidad que la dieta a base de harina de pescado; los ingredientes más digestibles fueron BB y WH (BB, ha sido usado para ensayos de crecimiento de tilapia, dando bajo peso, WH no había sido probado $P < 0.05$); los ingredientes vegetales fueron menos digestibles que la referencia. Con las mismas dietas se evaluó la digestibilidad *in vivo*, encontrando que las harinas animales FS y WH presentaron la mayor digestibilidad, junto con las harinas vegetales EB y EC ($P < 0.05$). Se determinó el estado fisiológico de los animales, mediante un ensayo de crecimiento de 60 días, con dietas isocalóricas ($320 \pm 5 \text{ Kcal g}^{-1}$) con el 15% de inclusión de los subproductos; como resultado se encontró que no hubo diferencias en las variables productivas del cultivo. Con los subproductos animales, se obtuvo baja eficiencia proteica (PER; peso ganado/proteína consumida) en particular con RC; los ingredientes FS y WH, presentaron el mayor transporte de glucosa (GLU) y

triglicéridos (TG) en sangre y FS mayor actividad enzimática digestiva ($P < 0.05$). Respecto a la inclusión de ingredientes vegetales la mayor actividad de proteasas y amilasa se mostró con EB ($P < 0.05$). Las tilapias, entre los diferentes tratamientos, no presentaron diferencias en el porcentaje de proteína corporal (58.6 ± 0.7). Por su parte, la expresión de genes hepáticos involucrados en el metabolismo (FASN) y crecimiento (IGF-1) se determinó mediante RT-PCR, utilizando el gen 18sRNA como normalizador. La mayor expresión del gen FASN se encontró en las tilapias alimentadas con RC; y para el gen IGF-1, con la dieta EC. También se utilizaron 3 horarios de alimentación, basados en la actividad enzimática digestiva circadiana, con los cuales no se obtuvieron diferencias en las variables productivas del cultivo ($P < 0.05$). En conclusión, la tilapia presentó mayor actividad enzimática digestiva durante la noche; aunque pudiera ser entrenada para diversos horarios de alimentación sin comprometer el crecimiento. Asimismo, los ingredientes WH, FS, EB y EC presentaron mayores niveles de digestibilidad y actividad enzimática, posiblemente por los pre-tratamientos aplicados. *O. niloticus* es capaz de utilizar diferentes subproductos animales y vegetales debido a su capacidad digestiva.

Palabras clave: Tilapia, *O. niloticus*, actividad enzimática, fisiología, horarios de alimentación, subproductos, digestibilidad, nutrición, nutrigenómica, RT PCR.

ABSTRACT

The effects of the inclusion of agro-industrial by-products of animal origin; [(FS) fish silage, (BB) bovine blood, (WH) whey and (RC) red crab flour] and plant origin; [(CH) chickpea, (EC) extruded chickpea, (EB) extruded bean, (CM) coconut paste and (JM) *Jatropha curcas* paste] were evaluated *in vivo* and *in vitro* digestibility, digestive enzymatic activity, nutritional status and gene expression in tilapia *O. niloticus*. To evaluate the *in vitro* digestibility, the schedules of greater digestive enzymatic activity of tilapia were determined by the description of the circadian cycle, under fast conditions and with alimentary stimulus (*ad libitum*), of pepsin, alkaline proteases, amylases and lipases. The results showed an enzymatic production regulated by photoperiod, with higher enzymatic activity during night time and an increase in activity by food intake. At random from the culture pond, tilapias were taken between 19:00 and 23:00 h (time of high enzymatic activity), for its dissection and the obtaining of the digestive system, to prepare the enzymatic extracts to determine the *in vitro* digestibility, in the acid phase with the stomach extract (pepsin) and later in the alkaline phase with the intestinal multienzyme extract (alkaline proteases). All diets that included 30% animal or plant by-products had a higher digestibility than the fishmeal-based diet; the most digestible ingredients were BB and WH (BB, has been used for tilapia growth trials, giving low weight, WH had not been tested $P < 0.05$); the vegetable ingredients were less digestible than the reference. With the same diets, the *in vivo* digestibility was evaluated, finding that the FS and WH animal flours presented the highest digestibility, together with the vegetable flours EB and EC ($P < 0.05$). The physiological state of the animals was determined by means of a 60-day growth test with isocaloric diets ($306 \pm 9 \text{ Kcal g}^{-1}$) with 15% inclusion of by-products; thus, it was found that there were no differences in the productive variables of the crop. With the animal by-products, low protein efficiency (PER; gained weight/protein consumed) was obtained with RC particularly; the FS and WH ingredients presented the highest transport of glucose (GLU) and triglycerides (TG) in blood and higher FS digestive enzymatic activity ($P < 0.05$). Regarding the inclusion of plant ingredients, the higher activity of proteases and amylase was shown with EB ($P < 0.05$). Tilapias,

among the different treatments, did not present differences in the percentage of corporal protein (58.6 ± 0.7). Likewise, the expression of hepatic genes involved in metabolism (FASN) and growth (IGF-I) was determined by RT-PCR using the 18sRNA gene as a normalizer. The highest expression of the FASN gene was found in RC-fed tilapia; and for the IGF-1 gene, with the EC diet. Three feeding schedules were also used, based on the circadian digestive enzyme activity, with which no differences were obtained in the crop production variables ($P < 0.05$). In conclusion, tilapia presented greater digestive enzymatic activity during night time; although it could be trained for various feeding schedules, without compromising growth. Also, the WH, FS, EB and EC ingredients presented higher levels of digestibility and enzymatic activity, possibly due to their pre-treatment. *O. niloticus* is able to use different animal and plant by-products due to its digestive capacity.

Keywords: Tilapia, *O. niloticus*, enzyme activity, physiology, feeding schedule, byproducts, digestibility, nutrition, nutrigenomics, RT PCR.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	3
2.1.1 Producción mundial y en México.....	4
2.1.2 Nutrición	4
2.2 Subproductos agroindustriales	5
2.2.1 Subproductos de origen animal.....	6
2.2.2 De origen vegetal	9
2.3 Proceso digestivo en la tilapia	12
2.3.1 Reducción mecánica	13
2.3.2 Digestión química.....	13
2.4 Digestibilidad de nutrientes	14
2.4.1 Digestibilidad <i>in vitro</i>	15
2.4.2 Digestibilidad <i>in vivo</i>	16
2.5 Enzimas digestivas	16
2.5.1 Proteasas	17
2.5.2 Glucosidasas (amilasas)	18
2.5.3 Lipasas	19
2.6 Estudio de la actividad enzimática	19
2.6.1 Efecto de la nutrición en la actividad enzimática digestiva.....	19
2.6.2 Ciclo circadiano de la producción de enzimas digestivas.....	20
2.7 Nutrigenómica	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVO GENERAL	24
4.1 Objetivos específicos	24
5. HIPÓTESIS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Experimento I. Ensayo de ciclo circadiano en estado basal y con estímulo alimenticio en tilapia <i>O. niloticus</i>	26
6.1.1 Obtención de los organismos y muestreado	26
6.1.2 Preparación de extractos enzimáticos.....	26
6.1.3 Análisis de actividad enzimática.....	27
6.1.4 Análisis estadístico.....	29

6.2 Digestibilidad <i>in vitro</i>	30
6.2.1 Preparación del reactivo de enzimas digestivas	30
6.2.2 Diseño experimental.....	30
6.2.3 Ingredientes prueba	31
6.2.4 Análisis estadísticos	33
6.3 Experimento II. Ensayos de crecimiento a horarios de alimentación circadiana	33
6.3.1 Obtención de los organismos.....	33
6.3.2 Diseño experimental.....	33
6.3.3 Análisis estadístico.....	38
6.4 Experimento III. Ensayos de digestibilidad <i>in vivo</i>	38
6.4.1 Diseño experimental.....	38
6.4.2 Coeficientes de digestibilidad	38
6.4.3 Análisis estadísticos	40
6.5 Experimento IV. Ensayos de crecimiento con dietas que incluyen subproductos agroindustriales	40
6.5.1 Preparación de dietas	40
6.5.2 Diseño experimental.....	40
6.5.3 Utilización del alimento e índices somáticos	41
6.5.4 Parámetros sanguíneos	41
6.5.5 Actividad enzimática.....	42
6.5.6 Composición proximal corporal	45
6.5.7 Análisis estadísticos	45
6.6 Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR	45
6.6.1 Muestreo	45
6.6.2 Extracción de RNA.....	46
6.6.3 Síntesis de cDNA	46
6.6.4 Selección de genes asociados al metabolismo de nutrientes (oligonucleótidos).....	46
6.6.5 PCR en punto final y cuantitativa	48
6.6.6 Determinación de la expresión relativa	49
7. RESULTADOS	50
7.1 Experimento I. Ensayo de ciclo circadiano en estado basal y con estímulo alimenticio	50
7.1.1 Actividad enzimática.....	50

7.1.2 Comportamiento.....	52
7.2 Digestibilidad <i>in vitro</i>	55
7.3 Experimento II. Ensayos de crecimiento a horarios de alimentación circadiana	59
7.4 Experimento III. Ensayos de digestibilidad <i>in vivo</i>.....	60
7.5 Experimento IV. Ensayos de crecimiento.....	61
7.5.1 Variables de crecimiento, eficiencia alimenticia e índices somáticos	62
7.5.2 Parámetros sanguíneos y actividad enzimática digestiva	62
7.5.3 Composición química corporal	64
7.5.4 Correlaciones	65
7.6 Expresión de genes de tilapia, <i>O. niloticus</i> alimentados con dietas de subproductos agroindustriales incluidos al 15%	67
7.6.1 Pruebas iniciales de los oligonucleótidos utilizados	67
7.6.2 Determinación de la eficiencia de la reacción	68
7.6.3 Selección del mejor gen normalizador	70
7.6.4 Expresión relativa.....	70
8. DISCUSIONES.....	71
8.1 Experimento I. Ciclo circadiano de las enzimas digestivas.....	71
8.1.1 Actividad enzimática digestiva basal de tilapia <i>O. niloticus</i>	71
8.1.2 Actividad enzimática circadiana con estimulación alimenticia de tilapia <i>O. niloticus</i>	72
8.2 Digestibilidad <i>in vitro</i>	73
8.3 Experimento II. Crecimiento en horarios circadianos	75
8.4 Experimento III. Digestibilidad <i>in vivo</i>	76
8.5 Experimento IV. Crecimiento con subproductos agroindustriales	78
8.6 Expresión de genes	80
9. CONCLUSIONES	83
Experimento I.....	83
Experimento II.....	83
Experimento III.....	83
Experimento IV.....	83
9.1 Conclusiones generales.....	84
10. LITERATURA CITADA	85
11. ANEXOS	106
ANEXO A. Artículo científico generado del experimento I.....	106

ANEXO B. Artículo científico generado de digestibilidad <i>in vitro</i>	115
ANEXO C. Artículo científico generado del experimento III y IV	136

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Actividad tipo pepsina en tilapia, <i>O. niloticus</i> .	50
2	Actividad de proteasas alcalinas en la tilapia, <i>O. niloticus</i> .	52
3	Actividad amilasa en tilapia, <i>O. niloticus</i> .	53
4	Actividad lipasa en tilapia, <i>O. niloticus</i> .	53
5	Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas que incluyen ingredientes de origen animal en tilapia (<i>O. niloticus</i>).	57
6	Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas que incluyen ingredientes vegetales en tilapia (<i>O. niloticus</i>).	57
7	Digestibilidad <i>in vitro</i> de ingredientes de origen animal en tilapia (<i>O. niloticus</i>).	58
8	Digestibilidad <i>in vitro</i> de ingredientes vegetales en tilapia (<i>O. niloticus</i>).	58
9	Perfil de crecimiento en horarios de alimentación circadiana en tilapia (<i>O. niloticus</i>).	59
10	Análisis electroforético de productos de PCR en punto final utilizando los oligonucleótidos para cada una de los genes de interés.	68
11	Curva de eficiencia de los oligonucleótidos para los genes FASN e IGF-1.	69
12	Curva de eficiencia de los oligonucleótidos para el gen normalizador 18sRNA.	69

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Análisis proximales de los ingredientes experimentales	35
2	Formulación y composición proximal de las dietas experimentales	36
3	Horarios de alimentación circadiana	37
4	Composición química proximal de ingredientes usados en dietas para bioensayo de crecimiento de <i>O. niloticus</i>	43
5	Dietas experimentales para ensayo de crecimiento por porcentaje de inclusión <i>O. niloticus</i>	44
6	Genes de interés	47
7	Genes normalizadores	47
8	Comportamiento de las enzimas digestivas durante el ciclo circadiano de la tilapia, <i>O. niloticus</i>	54
9	Valores equivalentes de leucina en la digestión <i>in vitro</i>	56
10	Resumen del bioensayo de crecimiento a horarios de alimentación circadiana	60
11	Digestibilidad aparente de materia seca (ADC_{DM}) y proteína (ADC_{CP}) y materia seca de los ingredientes (ADC_{IDM}) y proteína (ADC_{ICP}) de las dietas experimentales para <i>O. niloticus</i>	61
12	Parámetros de crecimiento de la tilapia, <i>O. niloticus</i> alimentada con subproductos agroindustriales durante 60 días	63
13	Parámetros hematológicos y bioquímicos de la sangre de tilapia <i>O. niloticus</i> alimentada con diferentes ingredientes experimentales durante 60 días	64
14	Actividad enzimática (UT) en tilapia <i>O. niloticus</i> alimentada con diferentes ingredientes experimentales durante 60 días	65
15	Composición química corporal de los peces alimentados con subproductos agroindustriales	66
16	Ecuaciones de regresión que relacionan los parámetros de	66

respuesta y coeficientes de digestibilidad (ADCs), peso final (FBW), longitud total (TL), tasa de crecimiento específica (SGR), peso ganado (WG), tasa de crecimiento específico (FCR), eficiencia alimenticia (FER), eficiencia proteica (PER), hematocrito (HEM) y actividad de quimotripsina (chy)

- 17** Expresión relativa de tilapia *O. niloticus* bajo diferentes tratamientos de alimentación 70
-

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Título	Página
A	Artículo científico generado del experimento I	106
B	Artículo científico generado de digestibilidad <i>in vitro</i>	115
C	Artículo científico generado del experimento III y IV	136

1. INTRODUCCIÓN

La producción y captura de peces son importantes para la seguridad alimentaria y nutricional a nivel mundial, ayudando a la reducción de la pobreza y el bienestar general. La demanda de pescado aumenta día a día, debido a que la población mundial se incrementa a una tasa promedio del 1.6% y el consumo *per cápita* aumentó de 7.5 kg en el 2007 a más de 20 kg para el 2016, este incremento, se ha debido a una combinación de crecimiento demográfico, aumento de ingresos, urbanización y a la disponibilidad por el producto procedente de la acuicultura (FAO, 2016). Además, el consumo de pescado proporciona energía, proteínas y una serie de nutrientes esenciales. La producción acuícola crece constantemente y se estima que pronto proporcionará la mayor parte de todo el pescado que consume la humanidad; en líneas generales, la producción de la pesca de captura se ha estabilizado (FAO, 2014).

Las tilapias (*Oreochromis niloticus*) son cíclidos omnívoros del África, que debido a sus características óptimas para su cultivo, actualmente se encuentran distribuidas en la mayoría de los países (Eknath y Hulata, 2009). Las tilapias son el segundo grupo más grande de peces cultivados, que cuadruplicó la producción en la última década. Esto es debido a su facilidad de cultivo: tolerancia a la sobrepoblación, crecimiento rápido, alto valor comercial, precios de mercado estables, relativamente fácil desove en cautiverio durante todo el año, alta resistencia a enfermedades, éxito en policultivo y aprovechamiento de dietas de bajo costo con ingredientes vegetales y procesados (El-Sayed, 1999; Shiau y Hsu, 2002; FAO, 2014). Es necesario tener en cuenta las necesidades nutricionales de la especie y la relación de los factores que influyen, así como la implementación de las estrategias más adecuadas de alimentación.

Las enzimas digestivas son algunos de los factores que influyen en el consumo de los alimentos (Jun-Sheng *et al.*, 2006). Algunas de las enzimas implicadas en la digestión en la tilapia, son la pepsina, amilasa, tripsina, fosfatasa alcalina y esterasa (Nagase, 1964; Cockson y Bourne, 1972; Moriarty, 1973; Klaren *et al.*, 1993; Li y Fan, 1997; Tengjaroenkul *et al.*, 2000). Esta secreción enzimática, está controlada

por ritmos circadianos regulados por el tiempo de luz y la fase de oscuridad. El fotoperiodo, es el factor más importante que dirige los ritmos circadianos en los animales, incluidos los ciclos de síntesis y secreción enzimática, ligados a los ritmos diarios de melatonina (Bromage *et al.*, 2001). Asimismo, las variaciones en la calidad y cantidad de nutrientes de la dieta influyen en la digestibilidad, el crecimiento, la composición bioquímica corporal, hematocrito, la actividad enzimática digestiva (Lundstedt *et al.*, 2004) y la expresión de genes que regulan el crecimiento (Jordal *et al.*, 2005) y el metabolismo (Leaver *et al.*, 2008).

Uno de los retos más importantes que enfrenta la industria de la tilapia es el desarrollo de dietas de bajo costo, que sean eficaces y altamente digestibles (Ng y Hanim, 2007). De esta manera, la ingesta, la digestión y asimilación de los alimentos y su efecto en el crecimiento y la supervivencia de la tilapia, juegan un papel muy importante. Por ejemplo, la configuración del intestino proporciona una ventaja a la tilapia del Nilo en la digestión y absorción de nutrientes cuando se ofrece una dieta herbívora con baja eficiencia energética (Tengjaroenkul, 2000), en el que enzimas, productos químicos y componentes proximales afectan directamente a su respuesta de crecimiento.

Además de optimizar las estrategias de alimentación, la producción de alimentos acuícolas requiere flexibilidad en las formulaciones basadas en el aporte de nutrientes a partir de ingredientes alimentarios y aditivos para sustituir las materias primas escasas como la harina de pescado y otras fuentes sujetas a fluctuaciones en costo y disponibilidad (Tacon *et al.*, 2011); una solución, es el uso de subproductos agroindustriales, que pueden ser una opción de alta calidad nutricional y bajo costo.

Si bien es cierto que se han realizado diversas investigaciones para la evaluación de ingredientes alternativos de bajo costo que incluyen subproductos animales y vegetales para las dietas de tilapia (por ejemplo: Fagbenro y Jauncey, 1993; Plascencia–Jatomea *et al.*, 2002; Sklan *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2013; Obirikorang *et al.*, 2015; Thongprajukaew *et al.*, 2015); aún se requieren estudios nutricionales que permitan identificar y predecir cuales son los ingredientes que brindan el mejor crecimiento de las tilapias, determinando parámetros comúnmente

relacionados con la fuente de alimento, tales como aumento de peso, crecimiento y supervivencia (García-Ulloa *et al.*, 2013; Job *et al.*, 2015) y el balance de energía alimentaria, que se utilizan como herramientas de evaluación para interpretar correctamente el rendimiento del cultivo de peces por una dieta o un ingrediente dado.

Existen otras variables biológicas que se utilizan para explicar las respuestas de crecimiento de la tilapia. Algunos de ellos se centran en la actividad de las enzimas digestivas y análisis de la sangre como el hematocrito (Sheng *et al.*, 2006; Abdel-Tawwab, 2012), la composición proximal del pescado (Bruno-Santos *et al.*, 2012), índices somáticos (Francis *et al.*, 2001) y la expresión de genes hepáticos (Jordal *et al.*, 2005; Panserat *et al.*, 2008; Leaver *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de los informes incluyen información parcial, ya que sólo unos pocos indicadores se aplican al evaluar los elementos nutricionales. Por lo tanto, es necesario determinar el potencial de los nuevos ingredientes a través de análisis por métodos prácticos y eficaces que permitan seleccionar los mejores ingredientes para nuevas formulaciones acuícolas y conocer los efectos metabólicos que trascienden en el organismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Las tilapias son un grupo de cíclidos omnívoros que son nativos de África y se han introducido, ya sea deliberada o accidentalmente en todo el mundo (Eknath y Hulata, 2009). Son el grupo de peces cuya producción ocupa el segundo lugar en la acuicultura mundial, con una contribución a la producción de aproximadamente 20% del total de peces (FAO, 2015).

La tilapia es omnívora, por lo que ingiere una amplia variedad de organismos incluyendo plancton, invertebrados, larvas de peces, detritos y materia orgánica en descomposición (Bruton y Bolt, 1975; Trewevas, 1983). La tilapia posee una gran capacidad de adaptación a diferentes temperaturas, rápido crecimiento, alta eficiencia en la conversión del alimento, tolerancia a baja calidad del agua; es

además, resistente a parásitos y enfermedades, tales características permiten cultivarla y manejarla con relativa facilidad (Pullin y Lowe–McConnell, 1982).

2.1.1 Producción mundial y en México

Para el 2014 se produjeron 4.85 millones de toneladas de tilapia a nivel mundial, de las cuales China produjo más de 1.6 millones para exportar a sus principales mercados, EUA y México.

Actualmente, Asia es responsable del 69% del total de la producción de tilapia del mundo, África del 20% y 11% son producidos en América. Con el inicio de las exportaciones en la década de 1990, la tilapia se volvió un producto internacionalmente conocido y demandado. Las exportaciones han crecido dramáticamente en la última década, con un promedio anual de 13.04%.

Egipto y Brasil están consumiendo toda su producción en el país, mientras que China e Indonesia dominan las exportaciones de productos congelados (80–85% del total) y las Américas dominan las exportaciones de producto fresco (15–20%) (FAO stat, 2015).

En México, actualmente, la producción no abastece la demanda en el mercado nacional de tilapia entera o fileteada, lo que ha ocasionado que en los últimos años el país se sitúe como el segundo importador mundial. Con la producción nacional y la importada, convirtiendo el volumen de filete importado a producto entero, México consume alrededor de 200 mil toneladas anuales (CONAPESCA, 2014).

El 91% de la producción de tilapia proviene de la acuicultura. En México, se cultiva en todos los estados, siendo los mayores productores: Chiapas, Tabasco, Guerrero, Estado de México y Veracruz (SAGARPA, 2011).

2.1.2 Nutrición

Ya que las tilapias son omnívoras requieren una alimentación balanceada para un óptimo crecimiento. Basados en cultivos de crecimiento, varios autores han realizado revisiones detalladas de los requerimientos nutricionales de la tilapia, definiendo que éstos varían para cada especie y estadio de desarrollo (Jauncey y Ross, 1982; El–Sayed y Teshima, 1991; Stickney, 1996). Por ejemplo, los alevines requieren una

dieta con mayor nivel de proteína, lípidos, vitaminas y minerales, así como un nivel bajo en carbohidratos y conforme van pasando a otros estadios se reduce la necesidad de proteína.

El componente determinante del crecimiento de esta especie es la cantidad y calidad de la proteína contenida en los alimentos balanceados que se ofrecen en el cultivo. Las proteínas desempeñan una diversidad de funciones, actuando como catalizadores, como elementos nutritivos y estructurales en los sistemas contráctiles, como reserva nutritiva y como vehículos de transporte; también actúan como hormonas y elementos de protección (Lehninger, 1984). Los demás nutrimentos como lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales en general no se modifican de manera marcada de acuerdo a la etapa de desarrollo, por lo que se recomiendan valores promedios de lípidos no menores del 4% y fibra cruda no superior al 6%.

2.1.2.1 Fuentes alternas de proteína en dietas para tilapia

El principal aporte de proteína de los alimentos balanceados para tilapia hoy en día provienen de la harina de pescado. Ya que este es el más caro de los componentes del alimento, la sustitución de la harina de pescado por otros ingredientes proteicos alternos de origen vegetal y animal de menor costo, disminuiría el costo de los piensos y por lo tanto aumentaría la rentabilidad del cultivo.

Existen diversos trabajos que evalúan ingredientes potenciales para sustituir a la harina de pescado (p.ej. Hernández *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Ogello *et al.*, 2014; Madage *et al.*, 2015). Las fuentes alternas de proteína representan una oportunidad para aumentar la eficiencia en el uso de los recursos para la alimentación y ofrecen interesantes posibilidades para incrementar la rentabilidad, dando también mayor flexibilidad al proceso de formulación. Desde el punto de vista comercial, es deseable que los ingredientes proteicos posean una concentración de proteína con poca variabilidad entre distintos lotes de un mismo ingrediente, y que además estén disponibles en el mercado a un precio accesible.

2.2 Subproductos agroindustriales

Los subproductos agroindustriales son una excelente alternativa de piensos de bajo costo y alta calidad, debido a que son abundantes y representar un desecho en el

sector donde fueron generados, y pueden ser una opción de insumos en otro sector (Domínguez, 1997), como es la fabricación de alimentos para el cultivo de la tilapia.

2.2.1 Subproductos de origen animal

a) Ensilado de tilapia

El desarrollo de la industria pesquera a nivel industrial y artesanal genera una gran cantidad de residuos y pérdidas en el manejo, almacenamiento, distribución y comercialización, los cuales representan alrededor de 29 millones de toneladas de desechos a nivel mundial (FAO, 2014). En México se produjeron, para el 2008, más de 550,520 toneladas de desechos (CONAPESCA, 2014). Esto ocasiona desperdicio de proteína de alta calidad y aumento de la contaminación ambiental. Dentro de los aprovechamientos más sustentables de estos desechos se encuentra la producción de ensilados de pescado para la elaboración de alimentos para aves, ganado y peces (Green *et al.*, 1988; Espe *et al.*, 1989; Espe *et al.*, 1992; Pérez, 1995; Ouellet *et al.*, 1997; Gerón *et al.*, 2007). Los ensilados biológicos se basan en la fermentación ácido-láctica y son un excelente producto proteico de alto valor para la alimentación animal y se elabora con especies de pescado de bajo valor comercial, desechos de peces marinos y del pescado de las industrias (Vidotti *et al.*, 2003). En su elaboración se han empleado, como inóculo, distintas cepas de bacterias ácido-lácticas y melaza como fuente de carbohidratos por su alta composición de azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa (Fagbenro, 1994; Cira *et al.*, 2002; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002).

Los aminoácidos más abundantes en los ensilados de tilapia son cisteína, lisina y leucina. Los valores de aminoácidos en mg/g son: treonina 2.32, arginina 2.23, tirosina 1.17, valina 1.93, fenilalanina 1.6, isoleucina 1.77, leucina 3.09, lisina 3.47, cisteína 6.39 y metionina 0.98 (García-Urias, 2012).

b) Langostilla

En México, uno de los recursos naturales con mayores probabilidades de utilizarse como ingrediente para alimentos balanceados es la langostilla, ya que se trata de un recurso abundante, que puede ser capturado de manera masiva y que además tiene

una composición química de gran valor para la nutrición animal. La langostilla es un crustáceo de la familia *Galatheidae* que en ocasiones llega a representar hasta el 70% de la fauna de acompañamiento en la pesquería de camarón en el golfo de California.

La composición proximal de la langostilla es variable según la zona de captura, la estación del año y la edad de los organismos, entre otros factores. Sin embargo, se ha reportado que los componentes más abundantes de la langostilla son la proteína (21.2–54.7%), ceniza (12.8–35.9%), quitina (4.76–21.6%) y el extracto etéreo (4.7–14%) (Castro–González *et al.*, 1995). Asimismo, su contenido de carotenoides es elevado 10–16 mg/ 100 g (Spinelli *et al.*, 1974). Por su parte, los aminoácidos y ácidos grasos son considerados como de buena calidad para la alimentación de organismos acuáticos (Villarreal, 1995). Los aminoácidos más abundantes son lisina, arginina y metionina. Los valores en g/100 g de proteína, son: histidina 5.47, treonina 3.0, arginina 8.79, valina 1.26, fenilalanina 6.35, isoleucina 1.54, leucina 3.35, lisina 10.24, metionina 7.67 y triptófano 1.21 (Vega–Villasante *et al.*, 2012).

c) Sangre de bovino

De acuerdo con información de SAGARPA (2015), Veracruz es el principal estado productor de ganado bovino en México con un volumen de producción de 249 mil toneladas, el segundo productor es Jalisco con 209 mil toneladas al año y le siguen los estados de Chiapas, Sinaloa y Baja California. De esta industria surgen un gran número de desechos comestibles de utilización en la alimentación animal, como, por ejemplo, sangre, grasas, huesos, orejas, etc., siendo el principal de todos estos la sangre de bovino, con un rendimiento de 26 litros por 1000 kilogramos de peso de animal vivo, lo que representa una media de 10–12 L por animal. En México la cantidad de sangre bovina recuperable se estimó en 0.917 millones de toneladas de sangre en el 2009, mostrando un comportamiento creciente (Ballesteros *et al.*, 2014).

La sangre completa de bovino presenta un 19.18% de proteína y 80.17% de humedad (Márquez *et al.*, 2005), y la harina de sangre de bovino contiene 88.1% de proteína (Kats *et al.*, 1994). El contenido de aminoácidos en el plasma presenta un

buen balance de aminoácidos, y la utilización de su proteína neta es equivalente al 95% de la caseína. El aislado de globina ha sido probado con hasta un 10% de inclusión en dietas para ratas, sin que estas sufran deficiencias nutricionales (Duarte *et al.*, 1999). No obstante, en diversas investigaciones se ha observado que la sangre de bovino es deficiente en dos aminoácidos esenciales, metionina e isoleucina (Duarte *et al.*, 1999; Bracho *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2005).

Los aminoácidos más abundantes son lisina y leucina. Los valores en mg/g de proteína, son: histidina 66.9, treonina 47.5, arginina 30, valina 77.6, fenilalanina 63, isoleucina 9.3, leucina 81.2, lisina 86.8, metionina 2.8, cisteína 8.54, tirosina 28.71 y triptófano 18.27 (Kats *et al.*, 1994; Bracho *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2005).

d) Suero lácteo

El suero de leche es el líquido que se obtiene por la coagulación de las proteínas presentes en la leche durante la elaboración del queso, una vez que se separa la porción aglomerada (la caseína) y la grasa (Spreer, 1991).

En la elaboración de quesos, se producen dos tipos de lactosuero, uno dulce y uno ácido, el primero de ellos se obtiene de la coagulación de leches no ácidas por la acción enzimática de la renina, produciendo quesos de pastas prensadas y pastas cocidas como son de los tipos: cheddar, manchego, chihuahua, entre otros. El lactosuero ácido se produce cuando el coágulo se forma por acidificación con un pH de 5.1 o menos, en la elaboración de quesos de pastas frescas y pastas blandas como son el tipo: cottage, ricotta, oaxaca, entre otros (Zadow, 1992). En la mayoría de las empresas se mezclan los dos tipos de lactosuero, generando un tercer tipo, el cual es utilizado en la elaboración de requesón. El suero que se genera después de la elaboración de requesón, es el que representa el problema, debido a que, en muchas empresas, este subproducto es desechado al ambiente. Por la cantidad de material orgánico contenido en el lactosuero, este se vuelve un excelente sustrato para diferentes microorganismos presentes en el ambiente. Del lactosuero producido en empresas mexicanas, el 36% aproximadamente es desechado al ambiente, el 3% reutilizado para fabricar quesos y el 60% es utilizado para alimentación de ganado. La lactosa es el principal componente, seguido de proteínas, materia grasa y sales

minerales. El suero es utilizado para la obtención de subproductos a través de la desecación y de esta manera se obtienen concentrados de proteínas o lactosa (Guerrero *et al.*, 2011).

Los perfiles típicos de la composición de aminoácidos de las proteínas del suero de leche indican una alta concentración de leucina y lisina. Los valores en g/100 g de proteína, son: histidina 2.20, treonina 4.80, arginina 2.32, valina 6.54, fenilalanina 3.62, isoleucina 5.65, leucina 13.29, lisina 8.98, metionina 3.41 (Sinha *et al.*, 2007).

2.2.2 De origen vegetal

a) Garbanzo

La producción mundial de garbanzo ha crecido en forma sostenida desde el año 2001, con una producción para el 2014 que supera los 13 millones de toneladas. El principal productor a nivel global es India, con 6,182,327 toneladas, representando un 67% de la producción mundial. El comercio de esta leguminosa alcanza un valor superior a los mil millones de dólares. En 2014, el principal exportador fue Australia con 8,449 toneladas, seguido de India y México, nuestro país fue el sexto exportador global con aproximadamente 44,000 toneladas (FAO Stat, 2015).

En México, el garbanzo para consumo humano, se siembra en los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California Sur. En el 2014 la producción nacional alcanzó 171,665 ton (FAO Stat, 2015).

A nivel nacional, Sinaloa se sitúa como el principal productor de esta leguminosa, cuya producción en el 2016 fue de 51,588 ton (SIAP, 2016). El garbanzo es una buena fuente de proteínas y carbohidratos (Chavan *et al.*, 1987). Presenta alto contenido en fibra soluble, además, posee cantidades importantes de vitaminas (ácido ascórbico y niacina) y minerales (Ca, P, Mg, Na, Fe, K) y representa un excelente suministro de ácidos grasos insaturados (oléico, linoléico) (Salunkhe *et al.*, 1982). El garbanzo se encuentra clasificado entre los granos cuyo contenido en proteínas es relativamente alto, teniendo en promedio 22% (Haard y Chism, 1998). Los factores que causan variación en el contenido de proteína incluyen el carácter genético, la localización geográfica y las condiciones de crecimiento (Chavan *et al.*,

1989). Las proteínas de reserva más importantes son las globulinas representando un 57% de la proteína total. Las glutelinas se encuentran en un 18%, albúminas 12% y prolaminas 3% (Singh y Jambunathan, 1982). Las proteínas de garbanzo son deficientes principalmente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano, pero poseen un alto nivel de lisina, la cual es relativamente deficiente en cereales (Singh y Jambunathan, 1982; Gupta, 1987). Según informes de Productores Unidos del Río Petatlán, alrededor del 10% de la producción total es considerada desperdicio por granos de bajo diámetro o quebrados, perdiendo hasta un 90% del valor comercial (PURP, 30 de abril de 2013).

Los valores de aminoácidos en g/100 g de proteína son: histidina 2.43, treonina 3.46, valina 3.54, isoleucina 3.19, leucina 7.14, lisina 6.39, metionina más cisteína 2.18 fenilalanina más tirosina 8.80, triptófano 1.1 (Sarmiento–Machado *et al.*, 2006).

b) Frijol

La producción de frijol en el mundo podría considerarse como reducida, si se compara con la producción de otros productos (trigo, soya, arroz). Este fenómeno se explica por el hecho de que tales granos forman parte de procesos agroindustriales que buscan su transformación, lo cual no sucede con el frijol, además de que el consumo del frijol está determinado por las preferencias de ciertas variedades (SIAP, 2009). La producción mundial de frijol, durante el 2014, fue de 25,093,616 ton, siendo los principales productores: Brasil, India, China, Myanmar, México, Estados Unidos, Kenya y Argentina. A nivel nacional, la producción fue de 1,273,957 ton (FAO Stat, 2015).

El frijol es una fuente razonable de proteínas y una excelente fuente de carbohidratos complejos. Además, de su alto contenido de vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina y ácido fólico) y ciertos minerales (calcio, hierro, cobre, zinc, potasio, fosforo, magnesio) y una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolénico) (Sathe *et al.*, 1985). Se han reportado contenidos de proteína de 14–33% (Paredes–López *et al.*, 2006). Por la conformación física, este grano es susceptible a diseccionarse, perdiendo calidad y

precio, ya que no es apto para procesos agroindustriales, se estima que entre el 8–15% del grano es considerado subproductos por daños físicos y es ofrecido al ganado como alimento.

El frijol es rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Ulloa *et al.*, 2011).

c) Pasta de coco

La producción de coco va en incremento año tras año, en el 2014 se produjeron 61,440,691 ton en el mundo, en México 1,118,750 ton (FAO Stat, 2015). La industria del coco en México tiene un fuerte impacto en el empleo y la economía regional en los estados de Guerrero, Colima, Tabasco y Oaxaca, principalmente. México contribuye con aproximadamente el 7% de la producción mundial de copra. En la ganadería se utiliza la harina de coco, un subproducto de la extracción de aceite, como alimento para el ganado y en la agricultura se hacen abonos (SIAP, 2014).

De la copra, o endospermo seco, se extrae el aceite de coco y se usa en la fabricación de aceite para cocinar, margarina, manteca de cacao, jabones, lociones, perfumes y otros productos cosméticos, velas y como aceite para lanternas; posterior a esta extracción, queda la pasta residual.

Los contenidos de aminoácidos en g/100 g de proteína son: arginina 2.41, histidina 0.38, treonina 0.66, valina 1.04, isoleucina 0.83, leucina 1.44, lisina 0.60, metionina 0.32, cisteína 0.25, fenilalanina 0.86, tirosina 0.57, triptófano 0.20 (Allen, 1984).

d) Pasta de *Jatropha curcas*

México es un país de gran biodiversidad que alberga un alto número de plantas autóctonas. Una de éstas plantas poco investigadas es el piñón o piñoncillo (*Jatropha curcas* L.) (Félix, 2007). La semilla de *J. curcas* es una oleaginosa que por su elevado contenido de aceite tiene potencial de cultivo para la generación de biodiesel (De la Vega, 2008). La pasta residual que se obtiene como subproducto de extracción del biodiesel puede ser aprovechada para alimentación animal.

Makkar y Becker (1997) sustituyeron la harina de pescado por harina de *Jatropha curcas* en un 50%, alimentaron peces y no encontraron diferencias significativas con la dieta sin inclusión de *J. curcas*. Encontraron que contiene entre un 58 y 64% de proteína, con aminoácidos esenciales altos excepto lisina. Sin embargo, en un ensayo de solo 7 días, encontraron mucosidad en las heces (las inflamaciones y daños en la integridad de la mucosa intestinal favorece la infección de los peces por las bacterias patógenas presentes en el intestino) indicando un problema digestivo. Esto es consistente con trabajos en donde se observó que la alimentación con harina de semillas de la variedad no tóxica, sin tratamiento previo con calor, puede tener efectos subclínicos negativos en el desempeño de los animales a largo y mediano plazos. Los factores que restringen la utilización óptima de la harina de semillas proveniente de ambas variedades, tóxica y no tóxica, son: altos niveles de inhibidor de la actividad de la tripsina (21 a 27 mg de tripsina inhibida por cada gramo de materia seca); lectina (51 a 102 expresado como el inverso de la concentración mínima en miligramos de harina de semillas de *Jatropha* por mililitro en el ensayo que produjo hemaglutinación); fitatos (concentración entre 9 y 10%); saponinas (en niveles entre 2.6 y 3.4%); ésteres de forbol presente en la pulpa de las semillas de la variedad tóxica (2.2 a 2.7 miligramos por gramo, relativamente ausentes en la variedad Mexicana 0.11 miligramos por gramo) (Makkar y Becker, 2009).

Los aminoácidos más abundantes son cisteína, leucina y arginina. Los valores en mg/g son: histidina 2.39, treonina 4.56, arginina 8.07, tirosina 3.53, valina 1.23, fenilalanina 5.81, isoleucina 6.34, leucina 9.28, lisina 5.43, cisteína 17.08 y metionina 1.44 (García–Urias, 2012).

2.3 Proceso digestivo en la tilapia

Durante el proceso digestivo se lleva a cabo la ingesta inicial, la hidrólisis y la transferencia de los nutrientes hacia el interior del cuerpo. De aquí se deduce la importancia de obtener conocimiento detallado sobre la función digestiva, donde tienen un papel primordial diferentes enzimas, cuyo funcionamiento se ve afectado por factores ligados tanto a la fisiología del animal como a las características del alimento o la forma en que este es suministrado. La digestión del alimento es llevada

a cabo en dos tiempos: la reducción mecánica de las partículas alimenticias y la digestión química.

2.3.1 Reducción mecánica

El aparato digestivo de la tilapia inicia en la boca, cavidad faríngea, esófago, estómago, intestino proximal y distal, para terminar en el ano. La principal función digestiva de la boca es la ingestión del alimento y agua, mediante la acción coordinada de las mandíbulas, la lengua, el techo de la boca, los arcos branquiales y los opérculos. Los dientes mandibulares los utilizan para la captura y mantenimiento del alimento. Mientras que los dientes faríngeos y los asociados con las branquias se utilizan para la filtración y el encauzamiento del alimento hacia el interior del estómago. En las mandíbulas faríngeas es en donde inicia el proceso de reducción, ya que sirven para triturar el alimento en porciones más pequeñas, pero carecen de glándulas salivares liberando solo un mucus, que carece de actividad enzimática. La cavidad bucofaríngea posee en su interior papilas gustativas, implicadas en la percepción del sabor de los alimentos, aunque también se encuentran gran cantidad en el epitelio de la cabeza y de todo el cuerpo. Y es a nivel del esófago (el cual aún contiene papilas gustativas) donde se puede regurgitar el alimento no deseado (Lagler *et al.*, 1977).

2.3.2 Digestión química

Lo que sucede antes de que el alimento ingrese al estómago es una reducción mecánica de las partículas alimentarias, produciéndose la digestión química en el estómago e intestino.

a) Estómago

El proceso de digestión química inicia con la secreción de ácidos (concretamente HCl). El ácido clorhídrico *per se* puede producir una hidrólisis de los alimentos, además de contribuir a la digestión enzimática al proporcionar el pH óptimo para la actividad de enzimas (tipo pepsina) secretadas por el estómago. En el estómago hay un importante hidrólisis proteolítica, gracias a la acción de proteasas secretadas por las células glandulares del estómago. La proteasa mayoritaria es la pepsina

pudiendo haber otras enzimas con actividad análoga. La pepsina se secreta en forma de pepsinógeno (forma inactiva) y es activada por la presencia de un medio ácido (Castelló-Orvay, 1993).

b) Intestino

En el intestino es donde una serie de procesos químicos concluyen en la digestión total de los alimentos. Dichos procesos químicos se producen gracias a la acción de diferentes enzimas (que incluyen proteasas, carbohidrolasas y lipasas) cuya secreción procede de la pared intestinal (ciegos pilóricos) o de las glándulas anexas (páncreas e hígado). La bilis se produce en el hígado y se acumula en la vesícula biliar, facilita la digestión de los lípidos, gracias a la acción de las lipasas, mediante el aporte de sales biliares y compuestos tensioactivos capaces de emulsionar los lípidos. Además, regula el pH del intestino. El pH en el intestino anterior es neutro (debido a la llegada del alimento con pH ácido procedente del estómago) y en el posterior, es alcalino gracias a la secreción de bicarbonato secretado por el páncreas y de bilis (Castelló-Orvay, 1993).

2.4 Digestibilidad de nutrientes

La evaluación de la digestibilidad de un alimento, permite medir el aprovechamiento de un nutriente en una dieta. Un alimento artificial puede poseer todos los nutrimentos esenciales, pero aun así no producir un buen crecimiento, debido a que los nutrimentos no son aprovechados. La digestibilidad de un alimento por un animal, depende no sólo de este y de las condiciones ambientales, sino también de las características físicas del alimento y de la composición química de los nutrimentos (Lee y Lawrence, 1977). Entre los factores que se sabe afectan la digestibilidad de nutrientes en los peces son: la especie, tipo de alimentación, tamaño del alimento, frecuencia de la alimentación y tamaño/edad del pez (De Silva y Perera, 1984; Henken *et al.*, 1985; Usmani y Jafri, 2002).

Los coeficientes de proteína y energía digerible son requeridos para formular alimentos balanceados que cubran los requerimientos nutricionales, así como para permitir la sustitución efectiva de ingredientes con base en su costo y para reducir la producción de desperdicios (Akiyama *et al.*, 1989).

En general, las formulaciones de los alimentos se basan exclusivamente en la composición dietética y no en la composición digerible: por lo anterior, se pueden producir alimentos sobre-formulados, incrementando su costo y la descarga de efluentes, ya que la proteína es el ingrediente más costoso en alimentos balanceados y puede ocasionar la acumulación de nitrógeno orgánico en el agua de cultivo (Tacon, 1993), además, el alimento constituye una gran parte de los costos totales de producción (Tacon y Akiyama *et al.*, 1997; Sarac *et al.*, 1993). En contraste, formular con los valores de digestibilidad de los ingredientes, permite obtener ahorros adicionales a través de la optimización de dichas formulaciones (Tacon y Akiyama *et al.*, 1997). Uno de los valores que inicialmente se debe evaluar es la digestibilidad de la fuente proteica, con el fin de conocer los valores nutricionales digeribles por la especie en estudio (Akiyama *et al.*, 1989). Para lo cual existen dos métodos, la digestibilidad *in vivo* y ciertos diseños desarrollados para determinar la digestibilidad *in vitro*. Aunque los resultados de digestibilidad *in vitro* son menos aproximados al valor real, el método es más rápido y económico, particularmente cuando se requiere analizar un número alto de ingredientes o alimentos. Por lo tanto, la determinación de la digestibilidad *in vitro* es útil en la toma de decisiones rápidas sobre la selección de ingredientes para la acuicultura. Lo recomendable es realizar primero una corrida de digestibilidad *in vitro* y posteriormente, con los ingredientes seleccionados, realizar las pruebas de digestibilidad *in vivo*.

2.4.1 Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* en sistemas cerrados como el pH-stat se basa en la hidrólisis de enlaces peptídicos por la acción de enzimas proteolíticas y la medición de los protones liberados (por el consumo de hidróxido para mantener el pH constante) (Wei *et al.*, 2003; Wei y Zhimin, 2006), o mediante la medición de los aminoácidos libres (Hamdan *et al.*, 2009), lo cual permite la estimación del número de enlaces peptídicos hidrolizados durante el tiempo de reacción, para cuantificar su digestibilidad (Nolasco, 2008). La determinación de la digestibilidad *in vitro* por el método pH-stat, con las enzimas específicas de cada especie ha sido investigado en

algunos peces como *Salmon gairdneri* (Dimes *et al.*, 1994), Salmonidos (El-Mowafi *et al.*, 2000), *Argyrosomus regius*, *Dicentrarchus labrax* y *Oreochromis niloticus* (Hamdan *et al.*, 2009), *Oncorhynchus mykiss*, *Rachycentron canadum* y *Oreochromis niloticus* (Yasumaru y Lemos, 2014), *Gadus morhua* (Tibbetts *et al.*, 2011) y crustáceos como *Pennaeus vannamei* (Ezquerro *et al.*, 1998; Córdoba–Murrueta y García Carreño, 2002; Lemos *et al.*, 2009) con un potencial significativo para distinguir la calidad de los alimentos y para predecir la digestibilidad de la proteína en el animal vivo.

2.4.2 Digestibilidad *in vivo*

Los coeficientes de digestibilidad permiten cuantificar la fracción digestible del alimento, esto es, la cantidad de nutrientes absorbidos por el animal a partir de los nutrientes ingeridos. El método consiste en la utilización de marcadores que deben ser absolutamente inertes, carentes de ningún tipo de efecto comportamental o fisiológico en el animal, o metabolizable y no absorbible, que no interfiera con los procesos digestivos, como la absorción, secreción y tiempo de tránsito intestinal, y que sean fáciles de medir, que se añadan a la dieta y que dadas sus propiedades aparezcan intactos en las heces. El marcador utilizado clásicamente para los estudios de digestibilidad en peces es el óxido de cromo, Cr_2O_3 (Akiyama *et al.*, 1989), que se incorpora a la dieta en una tasa de 0.5–2%. La recolección de las heces debe realizarse rápidamente, para prevenir la pérdida de los nutrientes solubles que permanecen en las heces.

2.5 Enzimas digestivas

Una vez que el alimento es tragado, inicia el proceso de digestión, para lo que se requiere la acción de una serie de enzimas y otras sustancias que permiten al organismo obtener los nutrientes necesarios (azúcares, ácidos grasos y aminoácidos) para ser asimilados. Las enzimas son los catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de una reacción, sin verse alterada ella misma en el proceso global. El páncreas produce una gran diversidad de enzimas que digieren proteínas (proteasas), carbohidratos (glucosidasas) y lípidos (lipasas). Se han reportado varias enzimas intestinales involucradas en el proceso de digestión en la

tilapia tales como amilasa, pepsina, tripsina, esterasas y fosfatasas alcalinas (Nagase, 1964; Cockson y Bourne, 1972; Moriarty, 1973; Klaren *et al.*, 1993; Li y Fan, 1997).

2.5.1 Proteasas

Las proteasas (tripsina y quimotripsina) pertenecen a la familia de las serin–proteasas, son secretadas por el páncreas en forma de zimógenos, formas inactivas, que son activados en el interior del intestino mediante la acción de la enteroquinasa, una enzima secretada por la pared intestinal. Estas enzimas poseen el mismo sitio catalítico de acción, que contiene una serina, y presentan una elevada especificidad por el sustrato. Dependiendo de la secuencia aminoacídica de la cadena peptídica, la hidrólisis produce aminoácidos libres o péptidos de diversos tamaños. En el caso de los peces con estómago verdadero la hidrólisis de la proteína inicia con la acción de la pepsina en el estómago, posteriormente en el intestino por acción de las enzimas alcalinas pancreáticas y/o de los ciegos pilóricos (Castelló-Orvay, 1993). Así las endopeptidasas atacan los enlaces entre aminoácidos dentro de las cadenas polipeptídicas, mientras que las exopeptidasas hidrolizan los enlaces de los aminoácidos en los extremos de las cadenas.

a) *Tripsina*

La tripsina es una endopeptidasa, sus substratos son proteínas y péptidos de gran tamaño, que hidroliza para producir péptidos de menor tamaño. Su sitio de actividad proteolítica son las uniones internas de péptidos en los que la fracción carboxílica (COOH) es proporcionada por aminoácidos básicos como la arginina o la lisina. El pH óptimo para su actividad es de 8 a 9 y su temperatura óptima puede variar de 30 a 40 °C. La presencia de pequeñas cantidades de tripsina en el intestino cataliza la liberación de las endopeptidasas pancreáticas restantes y algunas exopeptidasas. Por lo que su función como activador enzimático la hace una enzima clave en la digestión de las proteínas (Voet, 2006).

b) Quimotripsina

La quimotripsina es otra endopeptidasa que se activa por acción de la tripsina sobre el quimotripsinógeno. Al igual que la tripsina sus substratos son proteínas y péptidos de gran tamaño que hidroliza para producir péptidos de menor tamaño. Es selectiva para los enlaces contiguos al extremo carboxílico de las cadenas laterales de aminoácidos como la tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina (Voet, 2006).

2.5.2 Glucosidasas (amilasas)

Los animales pueden digerir polisacáridos complejos, procedentes del mundo vegetal y animal, particularmente el almidón y el glucógeno, utilizando enzimas endógenas. Los peces cuentan con un mecanismo para la digestión de materiales difícilmente digestibles. Dicho mecanismo consta de los siguientes elementos: un ambiente ácido en el estómago y la presencia de una pared muscular gástrica potente, además, se han observado mecanismos de fermentación en una evaginación a modo de ciegos pilóricos en el intestino posterior (Álvarez-Díaz *et al.*, 2009).

Los carbohidratos encontrados en el alimento natural de los peces incluyen fundamentalmente almidón y celulosa (material vegetal), glucógeno (tejidos animales) y quitina (exoesqueletos de crustáceos e insectos); en peces omnívoros como la tilapia, principalmente celulosa, quitina y lignina (Sanz, 2009).

a) α -Amilasa

La enzima α -amilasa presente en el tubo digestivo de los animales (en la saliva y jugo pancreático) hidroliza la cadena lineal atacando los enlaces α (1–4) al azar a lo largo de la cadena para producir una mezcla de maltosa y glucosa (Melo y Cuamatzi, 2007). La única fuente de α -amilasa en los peces parece ser el páncreas exocrino (Jobling, 1995), aunque existen trabajos que consideran como fuente de dicha secreción enzimática el intestino (Sanz, 2009). La actividad amilasa encontrada en hígado y bilis puede ser debida a la infiltración de tejido pancreático en el tejido hepático, la detectada en el intestino medio y distal es de origen pancreático, mientras que no se conoce con certeza el origen de la observada en la parte del intestino proximal que podría deberse a un reflujo de la amilasa pancreática pero también, proceder del mismo alimento o de la microflora bacteriana (Sanz, 2009).

2.5.3 Lipasas

Este tipo de enzimas han sido clasificadas en dos tipos principales: las esterasas, que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tiene una cierta capacidad de solubilizarse y las lipasas verdaderas, que se distinguen porque hidrolizan enlaces éster en sustratos poco solubles. Estas enzimas se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático). La hidrólisis digestiva de los triglicéridos es activada por el ion Ca^{2+} y requiere de la presencia de un factor llamado colipasa (Canioni *et al.*, 1977). La acción de la lipasa sobre su sustrato se ve enormemente favorecida por la existencia de la interface agua-lípido, la cual es formada en el intestino debido a la acción emulsionante de las sales biliares o sus análogos (Peña-Díaz *et al.*, 2004).

2.6 Estudio de la actividad enzimática

Los estudios de actividad enzimática, incluyen la estandarización de los valores de sus unidades, por parte de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, los cuales se expresan en unidades internacionales (U), que representan la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto. La actividad puede expresarse en Unidades de enzima por gramo de tejido fresco o por mililitro de preparado enzimático, la actividad específica se expresa en unidades por miligramo de proteína, que constituye una medida de pureza de la preparación enzimática (Koolman y Röhm, 2004).

El conocimiento de la actividad enzimática digestiva permite comprender los mecanismos de digestión y propicia la optimización de la composición del alimento para una mejor nutrición de las especies cultivadas.

2.6.1 Efecto de la nutrición en la actividad enzimática digestiva

Como es sabido, existen dos aspectos fundamentales en el desarrollo de los organismos, uno corresponde a sus capacidades intrínsecas o genéticas, y el otro a las capacidades inducidas por un estímulo. Por lo tanto, los estudios de genética consideran los genes que codifican para una batería de enzimas que representan la capacidad enzimática en los animales. Así mismo, la actividad enzimática digestiva

está también ligada a la presencia o disposición de alimento y tipo de alimento que consumen los animales, por lo que es importante conocer también este último aspecto.

2.6.2 Ciclo circadiano de la producción de enzimas digestivas

En los peces y otros vertebrados, la capacidad para digerir nutrientes, depende de la secreción de enzimas apropiadas para llevar a cabo el proceso de hidrólisis y permitir la liberación de moléculas de tamaño que puedan ser absorbidas a lo largo del sistema digestivo por el organismo (Jun–Sheng *et al.*, 2006). Esta secreción de las enzimas digestiva es afectada por el ciclo circadiano (Bromage *et al.*, 2001).

Los ritmos circadianos constituyen el reloj biológico que regula las funciones fisiológicas de los organismos para que siga un ciclo regular que se repite cada 24 horas (Fuentes-Arderiu, 1998), incluyen efectos anátomo–fisiológicos modulados con la percepción de la luz. Diversos trabajos se han realizado sobre el efecto de los ritmos circadianos en peces, tales como la regulación de las hormonas reproductivas y melatonina en lobina (*Dicentrarchus labrax*) por estímulos de luz (Bayarri *et al.*, 2004). Asimismo, el pez cebra (*Danio rerio*), contiene osciladores circadianos y mecanismos de fototransducción de arrastre, lo que sugiere que las funciones de marcapasos circadiano pueden ser atribuidas en todo el animal (Cahill, 2002). El efecto circadiano respecto a la secreción enzimática digestiva puede ser medida desde dos criterios, con y sin estímulo alimenticio ya que se ha demostrado que la ingesta de alimentos modifica la secreción enzimática. Onishi *et al.* (1973, 1976) investigaron la actividad enzimática digestiva posterior a la ingesta de alimentos en *Cyprinus carpio*, demostrando un retardo de cinco horas para el aumento de las enzimas digestivas. Takii *et al.* (1985) observaron cambios en la actividad de las enzimas digestivas en anguila (*Anguilla japonica*) después de alimentarse, a nivel intestinal para las proteasas encontraron un punto máximo a las cinco horas y para las amilasas a las doce horas. Recientemente, se ha reportado que la fotorecepción de la retina es parte de los sistemas de regulación para los ciclos circadianos en la tilapia del Nilo *O. niloticus*; basada en la secreción de melatonina, la cual es una indolamina sintetizada principalmente en la glándula pineal y la retina y su nivel

fluctúa circadianamente con un incremento durante la noche y una disminución durante el día (Bromage *et al.*, 2001). La fluctuación periódica a intervalos de 24 h, considerada como ciclo circadiano, ha sido observada en la actividad locomotora (*Danio rerio*, Zhdanova *et al.*, 2001), el desarrollo (*Danio rerio*, Danilova *et al.*, 2004), el crecimiento (teleósteos, Falcón *et al.*, 2003) y la reproducción (salmon, Amano *et al.*, 2000, Amano *et al.*, 2004), entre otros. La glándula pineal de la mayoría de los peces está involucrada en la fotorecepción, la función endocrina y la regulación del reloj circadiano (Ekström y Meissl, 1997).

Por lo anterior, el conocimiento del ciclo circadiano de la actividad proteasa, lipasa y amilasa de la tilapia, que son enzimas fundamentales en la digestión de alimentos en los peces, puede sentar las bases para la optimización de la alimentación de la tilapia, particularmente para el establecimiento de los horarios de alimentación, para los juveniles en cultivo.

2.7 Nutrigenómica

La genómica nutricional o nutrigenómica estudia la interacción de los alimentos y sus componentes con el genoma a nivel molecular, celular y sistémico. La nutrigenómica aborda el efecto de los nutrientes sobre el genoma, proteoma y metaboloma. La revolución genómica ha catapultado el desarrollo de diferentes nuevas tecnologías que pueden ser aplicadas a las ciencias nutricionales. Las técnicas genómicas, proteómicas, metabonómicas y bioinformáticas ya están comenzando a despuntar para facilitar el estudio de las interacciones gen–nutriente a nivel celular, individual y poblacional.

Recientemente algunos autores han evaluado el efecto del reemplazo de aceite y harina de pescado por ingredientes de origen vegetal en la expresión de genes hepáticos en salmónidos (Jordal *et al.*, 2005; Panserat *et al.*, 2008; Leaver *et al.*, 2008). Este enfoque sugiere la existencia de algunos genes hepáticos como nuevos marcadores moleculares vinculados con la ingesta de los alimentos de origen vegetal. Por ejemplo, la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales, se asoció con la modificación de genes implicados en la biosíntesis de colesterol y la biosíntesis de ácidos grasos (Jordal *et al.*, 2005; Leaver *et al.*, 2008); mientras que, la sustitución de la harina de pescado por proteínas vegetales se vinculó con la

disminución de la capacidad de biosíntesis de proteínas y la variación en el metabolismo del nitrógeno (Panserat *et al.*, 2008).

Xiong *et al.* (2014) evaluaron el transcriptoma hepático diferencial de tilapias alimentadas con dietas isoenergéticas con alto y bajo contenido de proteínas por ocho semanas, mediante secuenciación masiva del RNA o RNA-seq. Los resultados mostraron que 71 genes fueron significativamente sobre expresados y 26 genes fueron significativamente reprimidos con la dieta baja en proteína. La expresión de diferentes genes fue asignada a 47 vías de señalización, incluyendo glucólisis, gluconeogénesis, la biosíntesis de aminoácidos, la lipogénesis y la lipólisis, entre otras.

Por otro lado, He *et al.* (2015) midieron el efecto de dietas con bajas y altas concentraciones de grasa sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos en la tilapia *O. niloticus* utilizando RT-qPCR. El estudio mostró que la dieta baja en grasa indujo la expresión de genes de la glucólisis y de la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado.

3. JUSTIFICACIÓN

La producción de tilapia en México debe aumentar rápidamente para suplir el creciente mercado interno y generar capital a través de acrecentar la exportación. No obstante, los altos costos de la harina de pescado y su desabastecimiento son una problemática para el sector productivo, por lo cual sería conveniente prescindir de este componente como el principal nutriente en la elaboración de piensos, y sustituirlo por insumos alternativos que no estén destinados para alimentación humana. Por lo tanto, es necesario realizar formulaciones de bajo costo, que optimicen el aprovechamiento de las fuentes de nutrientes, basadas en la capacidad fisiológica de las tilapias y en sus requerimientos nutricionales.

Para la fabricación de alimentos acuícolas de bajo costo, una alternativa, es el uso de algunos subproductos agroindustriales, que tengan valor depreciado y sean ricos en nutrientes. Aunque se ha descrito el uso de algunos subproductos agroindustriales en la alimentación de tilapia, no se ha investigado a detalle el efecto fisiológico de su incorporación; lo que en último término limita el uso en formulaciones de alimentos balanceados. Por lo tanto, el estudio de parámetros fisiológicos y de crecimiento, para evaluar la eficiencia alimenticia de los ingredientes alternativos en la dieta, representa la base para desarrollar la formulación del alimento adecuado para la tilapia, y obtener así, mayor rentabilidad en el cultivo de esta importante especie.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inclusión de subproductos de origen vegetal y animal en la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, actividad enzimática y expresión de genes metabólicos.

4.1 Objetivos específicos

1. Describir el ciclo circadiano de la secreción de enzimas digestivas en la tilapia, *O. niloticus*.
2. Determinar la digestibilidad *in vitro* de los ingredientes y dietas experimentales con las enzimas específicas de la tilapia, *O. niloticus*.
3. Evaluar la digestibilidad *in vivo* de los nueve subproductos agroindustriales incluidos en dietas para tilapia, *O. niloticus*.
4. Determinar el efecto de la inclusión de los subproductos agroindustriales en el crecimiento y estado nutricional de la tilapia, *O. niloticus*.
5. Correlacionar el estado nutricional de la tilapia, *O. niloticus* con la expresión de sus genes metabólicos.

5. HIPÓTESIS

Si los ingredientes vegetales tienen alto contenido de compuestos antinutricionales que inhiben la acción catalítica de las enzimas digestivas y/o que se unen a proteínas reduciendo su biodisponibilidad, se espera tengan una menor digestibilidad de sus proteínas, en relación con los ingredientes animales, entonces como respuesta se activará la expresión de genes para rutas energéticas alternas y para la síntesis de compuestos a partir de carbohidratos y/o lípidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Experimento I. Ensayo de ciclo circadiano en estado basal y con estímulo alimenticio en tilapia *O. niloticus*

6.1.1 Obtención de los organismos y muestreado

Se utilizaron tilapias (70.9 ± 10.3 g) provenientes del stock reproductivo del CIIDIR–IPN México ($25^{\circ}32'41''$ N, $108^{\circ}28'38''$ W). Las condiciones de crecimiento fueron 14 h luz:10 h oscuridad, 27 ± 1 °C y > 4 mg · L⁻¹ de oxígeno disuelto, 250 peces por tina (5000 L), y la dieta proporcionada contenía 30% de proteína cruda (Nutripec, Nutrimentos Purina, Guadalajara, México), alimentados *ad libitum*.

Se realizaron dos experimentos para determinar el ciclo circadiano de la actividad de la enzima digestiva:

- a) ciclo circadiano basal establecido en condiciones de ayuno; y
- b) ciclo circadiano establecido con condiciones de alimentación *ad libitum*.

Las tilapias se mantuvieron 24 h en ayuno antes de ser muestreadas. Tres muestras aleatorias de tilapias se recogieron cada hora, durante 24 h (n = 144; 72 peces por experimento) (Nolasco–Soria y Vega–Villasante 1998, Casillas–Hernández *et al.*, 2006). Los peces se sacrificaron por inmersión en agua fría y luego en hielo. Todo el trabajo que implicó el uso de los animales fue aprobado por un Comité Institucional de Cuidados y Uso de Animales (CIIDIR–IPN Sinaloa). Se registró el peso húmedo (± 0.0001 g) de los peces (EX324, Ohaus, Parsippany, NJ). Por disección se recuperaron el estómago e intestino, se pesaron y se almacenaron de forma individual a -20 °C, para el transporte aéreo a las instalaciones del CIBNOR para su análisis.

6.1.2 Preparación de extractos enzimáticos

El peso húmedo (± 0.1 mg) del estómago y de los intestinos de cada muestra se registró (APX–200, formerly Denver Instrument, Sartorius, Göttingen, Germany). Todas las muestras se mantuvieron en hielo durante este procedimiento para reducir la desnaturalización o daño de las enzimas. Se prepararon los extractos con agua

destilada de manera individual (tejidos / agua destilada, w / v 1: 3) antes de ser homogeneizados (Potter PRO 250, PRO Scientific, Oxford, CT). Las mezclas fueron doblemente centrifugadas $15\ 294 \times g$ a $4\ ^\circ\text{C}$ durante 10 min (5810–R, Eppendorf, Hamburg, Alemania), eliminando en cada vez la fase lipídica. Los sobrenadantes se almacenaron a $-20\ ^\circ\text{C}$, hasta su análisis.

6.1.3 Análisis de actividad enzimática

Se determinó la concentración de proteína soluble en los extractos de estómago e intestino (Bradford, 1976), usando albúmina de suero bovino (# A4503, Sigma–Aldrich) como estándar. La actividad de las proteasas ácidas (tipo pepsina) se determinó en el estómago (Anson, 1938; con ligeras modificaciones). Brevemente, la mezcla de reacción consistió en 1 mL de hemoglobina (# H2625, Sigma–Aldrich) (1% en buffer glicina–HCl, $100\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 2.0) y 20 μL de extracto multienzimático del estómago de tilapia, que se incubó a $25\ ^\circ\text{C}$ durante 30 min. La reacción se detuvo con 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se dejó reposar a $4\ ^\circ\text{C}$ durante 15 min. Las muestras se centrifugaron a $15\ 300 \times g$, a $4\ ^\circ\text{C}$. El sobrenadante se colectó y se diluyó con agua destilada (1:10) para tomar una lectura de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6405) utilizando cubetas de cuarzo (paso de luz de 1 cm). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de un equivalente de 1 μmol de tirosina por minuto.

Se determinó la actividad de las proteasas alcalinas en el extracto multienzimático del intestino (García–Carreño 1992), usando 500 μL de azocaseína (# A2765, Sigma–Aldrich) (1% w / v, en buffer Tris–HCl $100\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.0) como sustrato, 500 μL de Tris–HCl ($100\ \text{mmol} + 10\ \text{mmol}$ de CaCl_2 , pH 9.0) y 40 μL de extracto multienzimático del intestino de tilapia. La mezcla se incubó a $25\ ^\circ\text{C}$ durante 20 min. La reacción se detuvo con 500 μL de TCA al 20%. Las muestras se centrifugaron y la absorbancia se leyó a 440 nm. Una unidad de actividad de proteasa alcalina se definió como la cantidad de enzima requerida para aumentar 0.01 unidades $\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}$.

La actividad de la tripsina se determinó de acuerdo a Erlanger *et al.* (1961) con ligeras modificaciones, usando de sustrato BAPNA (# B4875, Sigma–Aldrich). La mezcla de reacción consistió en 10 μL de extracto multienzimático de intestino de tilapia + 160 μL Tris–HCl (60 mmol, pH 8.0) + 10 μL de cloruro de calcio (192 mmol Tris–HCl, 60 mmol, pH 8.0), iniciando la reacción con 10 μL de BAPNA. Para el control, se inactivó el extracto crudo (baño de agua a 95 °C durante 5 min). Se midió la absorbancia a 405 nm cada 15 s durante 30 min. Una unidad de actividad de tripsina se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de 4–nitroanilina $\cdot \text{min}^{-1}$.

De forma similar se determinó la actividad quimotripsina (Del Mar *et al.* 1979, con ligeras modificaciones), tal como se describe para la tripsina, pero utilizando SAPNA (# S7388, Sigma–Aldrich) como sustrato en DMSO y buffer 60 mmol de Tris–HCl, pH 8.0 y CaCl_2 , pH 8.0. Para los controles, el extracto crudo se inactivó (baño de agua a 95 °C durante 5 min). Una unidad de actividad quimotripsina fue definida como la enzima necesaria para liberar 1 μmol de 4–nitroanilida $\cdot \text{min}^{-1}$.

La actividad de la lipasa se determinó usando β –naftil caprilato como sustrato (Versaw *et al.*, 1989). La mezcla de reacción consistía en 100 μL de taurocolato de sodio (100 mmol), 1900 μL de Tris HCl (200 mmol, pH 8.0), 10 μL de extracto crudo del intestino y 10 μL de β –naftil caprilato (# N8875, Sigma–Aldrich) (100 mmol en DMSO). La mezcla se incubó a 25 °C durante 9.5 min, posteriormente se añadió 10 μL Fast Blue BB (100 mmol en DMSO) y la mezcla se incubó a la misma temperatura durante 0.5 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 200 μL TCA 0.72 N. Después se añadieron 2.7 mL de reactivo de acetato de etilo–etanol (1: 1, v: v) y los tubos se agitaron en vortex. Se leyó la absorbancia a 540 nm. Para los controles, se añadió el extracto crudo después de parar la reacción con el reactivo de TCA. Una unidad de actividad lipasa se definió como la enzima necesaria para liberar 1 μmol de β –naftol $\cdot \text{min}^{-1}$.

La actividad amilasa fue determinada utilizando almidón soluble (# S9765, Sigma–Aldrich) como sustrato (Vega–Villasante *et al.*, 1993). La mezcla de reacción contenía 490 μL de Tris HCl (50 mmol a pH 8.0), 10 μL de extracto de enzima, y 500 μL de la solución de almidón (1% Tris HCl, 100 mmol a pH 8.0). La mezcla se incubó

a 25 °C durante 10 min, después se añadieron 200 µL NaCO₃ (2 N) y 1500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) para detener la reacción. El desarrollo del color se llevó a cabo en un baño de agua a 90 °C durante 15 min. El color de la solución se diluyó hasta 10 mL de volumen final. Se leyó absorbancia a 550 nm. Para los controles, se aplicó el extracto crudo después de la adición de reactivo DNS. Una unidad de actividad de amilasa se definió como la enzima necesaria para liberar 1 µmol de glucosa · min⁻¹.

La actividad de proteasas, lipasas y amilasas se expresaron como el número de unidades de enzima por pez (unidades totales; UT). Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Mediante análisis de regresión de los resultados obtenidos de las 24 h, se representó el comportamiento circadiano de cada enzima, representados de manera lineal y polinómica de segundo y tercer grado. El análisis de regresión polinómica generaliza el análisis de covarianza en situaciones no lineales. La principal ventaja de este enfoque es comparar las actividades enzimáticas por hora (Draper y Smith, 1981; Freud y Little, 1981; Snedecor y Cochran, 1981).

Asimismo, se calcularon los patrones (ecuaciones de líneas, $P < 0.05$) para estos polinomios, para representar cada enzima de manera gráfica, la actividad enzimática fue promediada cada dos horas, en los mismos gráficos se ilustran las líneas de los polinomios.

6.1.4 Análisis estadístico

La normalidad y homogeneidad de varianza de los datos se analizaron con las pruebas Lilliefors y Bartlett (Sokal y Rohlf, 1995). Se aplicó análisis de regresión para determinar la significancia entre UT y tiempo. Para representar el comportamiento de cada enzima durante el ciclo circadiano se empleó regresión lineal, ecuaciones exponenciales y cuadráticas. Cuando los coeficientes de la ecuación fueron significativos y disminuyó la varianza residual de la regresión, entonces, se compararon con regresión lineal simple. ANOVA de una vía se utilizó para comparar las medias de UT de los promedios de cada dos horas muestreados, seguido por el test post hoc de Tukey para comparar los tratamientos (inanición vs la alimentación

ad libitum). La significancia se estableció en $P < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el software Statistica 7.0.

6.2 Digestibilidad *in vitro*

6.2.1 Preparación del reactivo de enzimas digestivas

El reactivo de enzimas digestivas se preparó utilizando los extractos crudos de mayor actividad enzimática, basados en los resultados del análisis del ciclo circadiano antes detallado, utilizando los extractos del periodo de las 19:00 a las 23:00 h. Se preparó el reactivo enzimático de cada órgano digestivo (estómago e intestino–ciegos pilóricos) con las tilapias muestreadas en los horarios seleccionados (15 tilapias, 88.2 ± 13.5 g). Se utilizó el mismo reactivo enzimático para todas las pruebas de digestibilidad *in vitro*.

Se determinó la actividad de proteasas ácidas tipo pepsina en los extractos de estómago, de acuerdo con la metodología de Anson (1938), usando hemoglobina (# H2625, Sigma–Aldrich) como sustrato 0.5%. Una unidad de proteasa ácida se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar un μmol de tirosina por min. En intestino y ciegos pilóricos se determinó la actividad de proteasas alcalina según el método empleado por Vega–Villasante *et al.* (1995), utilizando azocaseína (# A2765, Sigma–Aldrich) 1% como sustrato. Una unidad de proteasa alcalina se definió como la cantidad de enzima requerida para el aumento de 0.01 unidades de absorbancia a $440 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$.

6.2.2 Diseño experimental

La digestión *in vitro* de proteína fue dividida en dos partes (Akeson y Stahmann, 1964; Saunders *et al.*, 1973; Gauthier *et al.*, 1982; Desrosiers *et al.*, 1987; Thresher *et al.*, 1989; Yasumaru y Lemus, 2014), primero se realizó una digestión ácida con las enzimas digestivas del estómago a un pH de 2.0, de la siguiente manera: la fase ácida se simuló mediante la suspensión de una cantidad dada de sustrato deseado (6.25 mg de proteína del alimento / mL de reacción, 10 mL de volumen total) en HCl $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 2.0, para iniciar la digestión se añadieron 29.5 unidades de pepsina

(reactivo de enzimas digestivas ácidas de estómago de tilapia) y se incubaron durante 30 min a 37 °C con agitación constante (120 rpm). Después de este tiempo, el pH se elevó a 8.0 añadiendo NaOH 1 mol · L⁻¹ y la mezcla se transfirió al sistema pH-stat (842 Titrand, Metrohm AG, Suiza, conectado a un controlador y software Tiamo™ v. 2.2, Metrohm AG, Suiza) para la dosificación de NaOH, de acuerdo con la liberación de protones por la acción hidrolítica de los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos, manteniendo el pH constante. La segunda digestión se inició añadiendo 11.0 unidades de proteasa (reactivo de enzimas digestivas alcalinas de intestino y ciegos pilóricos de tilapia), con agitación constante durante 60 min. Los resultados se expresaron como la cantidad total de aminoácidos liberados y como la cantidad de aminoácidos libres en cada fase.

Se determinó la cantidad de aminoácidos contenidos en cada una de las muestras (ingredientes y dietas) antes de iniciar la primera digestión, considerado como tiempo cero; asimismo se cuantificó la cantidad de aminoácidos del biorreactor al terminar la digestión ácida y una última medición al concluir la digestión alcalina. La cuantificación de los aminoácidos fue de acuerdo a Church *et al.* (1983) usando el reactivo OPA, el cual se preparaba (Goodno *et al.*, 1981) al momento del análisis.

La digestibilidad ácida y alcalina se determinó como sigue: la digestibilidad ácida mediante la cuantificación de aminoácidos liberados solo durante la fase de incubación con el extracto de estómago y la fase alcalina, mediante la cuantificación de los aminoácidos liberados durante la hidrólisis en el pH stat. De tal manera que se consideró como digestibilidad *in vitro* de proteína a la suma de aminoácidos liberados en ambas fases; similar al método de Hamdan *et al.* (2009).

6.2.3 Ingredientes prueba

Los ingredientes se molieron (Grindmaster™, Model 505, Louisville, KY, USA) y tamizaron (250 µm; No. 60, FIIC, S.A. de C.V., México) antes de ser añadidos en la preparación de las dietas.

Ensilado de pescado (FS) se preparó a partir subproductos de tilapia (*O. niloticus*). Los desechos se trituraron (Torrey®, M-22RW), se almacenaron (-20 ° C) en bolsas de plástico hasta su uso. FS fue preparado en recipientes de plástico 5 L,

por cada kg de subproducto de pescado se agregó 15 mL de ácido fórmico para obtener un pH final de 3.8 a 4.0, FS se incubó a 29 ± 1 °C en condiciones anaeróbicas durante 7 días y se secó en un horno de convección a 60 °C durante 24 h. Suero de leche (WH) se obtuvo del suero de la leche de vaca fresca por tratamiento de ebullición (15 min). Fue centrifugada para eliminar la grasa y se añadió ácido láctico para permitir la precipitación de proteínas, que se recuperó mediante filtración en frío con una manta de algodón. Se secó a 60 °C durante 72 h (Fagbenro y Jauncey, 1993). Harina de sangre bovino (BB) se preparó a partir de sangre del matadero municipal de Tangancícuaro, Michoacán. La sangre fue secada al sol durante cinco días y se cubrió con una malla de plástico. Langostilla (RC) se obtuvo de cangrejos rojos frescos (*Planipes pleuronectes*) y se procesó en la planta industrial Pesquera Matancitas, B.C.S., México.

Frijol extruido (EB) se preparó a partir de granos (*Phaseolus vulgaris*) que se remojaron durante 1 h para eliminar la cutícula, se molió, tamizó y fue humidificada durante 24 horas a 26% antes de la extrusión. Se utilizó garbanzo (*Cicer arietinum*) simple (CH) y extruido (EC), el último fue humidificado 24 h previas a la extrusión (26% de humedad) (extrusor 20DN, CW BrabenderR Instruments, Inc, Nueva Jersey, EE.UU.). Se obtuvo harina de *Jatropha curcas* (JM) primero, usando una prensa mecánica (Grima–Biodiesel™, DF, México) para el corretaje de semillas (Prensa hidráulica Komet® DD85) y descascarado. Una proporción de 1.5/10 p/v de hexano se mezcló con la harina, se extrajo el hexano por filtración y posterior, secado al sol y se almacenó a 4 °C. Se preparó harina de coco (CM) con la pasta residual de la extracción del aceite, proporcionada por Copreros Unidos por Tabasco S. de R. L. P. R. de México, posteriormente fue molida a 200 micras. La composición química proximal de los ingredientes se muestra en Tabla 1.

Las dietas experimentales (Tabla 2) fueron: la dieta de referencia (RE) solo con harina de pescado (como ingrediente de referencia, RI) y nueve dietas adicionales con 30% de inclusión de los ingredientes prueba; las dietas experimentales contenían Cr₂O₃ inerte (para su uso en otro estudio experimental) y su presencia no se consideró como un factor influyente en este estudio. La formulación y composición proximal (humedad, proteína cruda, grasa, fibra cruda y

cenizas) de las dietas (Tabla 2), se determinó de acuerdo con la metodología de la AOAC (2005).

6.2.4 Análisis estadísticos

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados de los experimentos se presentan siempre en dos formas. Por un lado, la cantidad total de aminoácidos liberados durante cada etapa de digestión, y también como valores acumulados después de ambas digestiones. Los datos fueron analizados utilizando Statistica® de Stat Soft Inc.

Los valores de hidrolisis de ingredientes y dietas de la digestión ácida y alcalina y la digestión total fueron sometidos a ANOVA de una vía. Los valores de ambos sistemas se compararon mediante la prueba t, las diferencias entre medias fue detectada con la prueba de Tukey con $P < 0.05$.

6.3 Experimento II. Ensayos de crecimiento a horarios de alimentación circadiana

6.3.1 Obtención de los organismos

Los alevines (1.36 ± 0.1 g) para el bioensayo de horarios de alimentación circadiano, fueron de tilapia (*O. niloticus*) machos gift adquiridos en la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. ubicada en Mazatlán, Sinaloa. Los organismos se transportaron en bolsas con oxígeno y se aclimataron a la temperatura del agua en tina de 2 m^3 , todos juntos.

6.3.2 Diseño experimental

Con base en los resultados del ciclo circadiano de la secreción de enzimas digestivas en tilapia, se diseñaron 4 horarios de alimentación; 3 experimentales y 1 control (FAO, 2014) abajo descritos (Tabla 3). El bioensayo se dividió en dos fases, la primera, consistió en alevines de 1.3 ± 0.3 g, sembrados en tinajas de 1.7 m^3 , se alimentaron 3 veces al día en los horarios experimentales, durante 45 días, se realizó

sifoneo diario a las 9:00 h todos los días, biometrías y recambios parciales cada 15 días.

Una vez transcurrido el periodo, los juveniles (53.9 ± 13.5 g) se transfirieron a tinas de 7 m^3 se continuó el mismo ritmo de alimentación en los horarios experimentales y se mantuvo la calidad y parámetros óptimos de las tinas durante los 45 días restante. Una vez concluido el periodo del cultivo, los peces se cosecharon y determinaron los parámetros de crecimiento.

Tabla 1. Análisis proximales de los ingredientes experimentales

Ingredientes									
	FS	RC	BB	WH	EC	CH	EB	CM	JM
Humedad, %	8.19±0.11	2.09±0.03	6.92±0.04	8.21±0.06	9.58±0.08	7.70±0.01	10.85±0.17	7.87±0.99	5.43±0.02
Proteína cruda, %	42.86±0.37	43.16±3.02	83.50±0.93	80.66±0.73	21.39±0.02	19.68±0.62	24.43±0.57	20.93±0.68	40.91±0.34
Lípidos, %	28.73±0.61	1.09±0.15	0.69±0.02	1.53±0.06	6.45±1.06	7.34±0.14	0.52±0.05	1.94±0.16	32.12±0.15
Cenizas, %	16.93±1.60	32.64±0.09	3.96±0.02	2.32±0.00	3.25±0.02	3.96±0.08	3.48±0.02	9.80±0.20	6.60±0.05
Fibra cruda, %	0.20±0.03	11.42±0.51	0.62±0.05	0.42±0.01	1.67±0.01	2.25±0.06	1.03±0.15	6.99±0.28	3.36±0.67
NFE, %	11.27	11.70	11.24	15.09	67.21	66.79	70.54	60.28	17.03

NFE extracto libre de nitrógeno

Ingredientes: (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

Tabla 2. Formulación y composición proximal de las dietas experimentales

Ingredientes	Dietas ¹ (g/100g)									
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Harina de pescado	31.8	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2
Harina de trigo	35.0	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4
Pasta de soya	20.0	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9
Grenetina	4.0	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Aceite de pescado	3.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Lecitina de soya	3.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Vitaminas y minerales	2.2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Óxido de cromo	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ensilado	—	30.0	—	—	—	—	—	—	—	—
Langostilla	—	—	30.0	—	—	—	—	—	—	—
Sangre de bovino	—	—	—	30.0	—	—	—	—	—	—
Suero lácteo	—	—	—	—	30.0	—	—	—	—	—
Garbanzo	—	—	—	—	—	30.0	—	—	—	—
Garbanzo extruido	—	—	—	—	—	—	30.0	—	—	—
Frijol extruido	—	—	—	—	—	—	—	30.0	—	—
Pasta de coco	—	—	—	—	—	—	—	—	30.0	—
<i>Jatropha curcas</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30.0
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Composición proximal (%)										
Humedad	5.4±0.68	7.6±0.11	8.0±0.11	9.4±0.38	10.1±0.07	9.6±0.02	11.2±0.16	9.9±0.01	8.7±0.13	5.5±1.62
Proteína cruda	44.3±4.85	42.8±2.62	38.3±2.14	53.8±0.62	53.9±0.77	38.1±1.40	38.4±0.34	37.5±0.11	37.9±2.04	38.1±1.86
Lípidos	9.7±0.11	14.5±0.12	10.1±0.65	7.2±0.16	6.4±0.10	13.2±0.19	7.9±0.01	6.8±0.10	9.3±0.02	21.9±1.40
Cenizas	5.4±1.48	10.2±0.03	14.5±0.02	6.6±0.05	6.1±0.04	6.6±0.02	6.4±0.03	4.2±0.05	8.4±0.06	7.1±0.01
Fibra cruda	0.9±0.04	0.5±0.02	2.8±0.06	0.35±0.02	0.6±0.02	1.1±0.07	1.0±0.01	0.8±0.01	2.8±0.07	1.3±0.17
NFE	39.8	32.1	34.4	32.2	33.0	41.0	46.5	50.8	41.6	31.7

NFE extracto libre de nitrógeno

¹Dieta: (1) Dieta de referencia; (2) Dieta con 30% de ensilado de pescado; (3) Dieta con 30% de harina de langostilla; (4) Dieta con 30% de sangre de bovino; (5) Dieta con 30% de suero de leche; (6) Dieta con 30% de garbanzo; (7) Dieta con 30% de garbanzo extruido; (8) Dieta con 30% de frijol extruido; (9) Dieta con 30% de pasta de coco; y (10) Dieta con 30% de *Jatropha curcas*.

²Premezcla de vitaminas y minerales (g/kg alimento): tiamina, 0.011; ácido fólico, 0.005; riboflavina, 0.02; piridoxina, 0.011; colina, 0.275; ácido pantoténico, 0.0035; niacina, 0.088; vitamina B₁₂, 0.00001; vitamina K, 0.0044; vitamina D₃, 0.000055; vitamina E, 0.04422; ácido ascórbico 0.375; calcio, 3.0; fósforo, 7.0; magnesio, 0.5; yodo, 0.001; hierro, 0.15; cobre, 0.003; zinc, 0.20; manganeso, 0.013; selenio, 0.0004.

Tabla 3. Horarios de alimentación circadiana

Tratamiento	Diseño	Horario de alimentación			Criterio
1	Experimental	16:00	20:00	00:00	4 horas previas al pico máximo
2	Experimental	20:00	00:00	04:00	Iniciar exacto en la máxima segregación
3	Experimental	14:00	18:00	22:00	Iniciar cuando empieza el incremento
4	Control	08:00	12:00	17:00	Durante el día; FAO, 2014

6.3.3 Análisis estadístico

La normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante el análisis de Bartlett (Sokal y Rohlf, 1995) y de Lilliefor. ANOVA de una vía y pruebas de rangos múltiples de Tukey se utilizaron para detectar diferencias en los valores medios entre los parámetros de crecimiento. (software Statistica 7.0, Statsoft, Tulsa, OK). La significancia se estableció en $P < 0.05$ para todos los análisis.

6.4 Experimento III. Ensayos de digestibilidad *in vivo*

En los ensayos de digestibilidad *in vivo* se analizaron los 9 subproductos agroindustriales, incluidos en 10 dietas experimentales (las mismas que se emplearon para determinar la digestibilidad *in vitro*, Tabla 2), una dieta fue formulada como dieta de referencia y a partir de esta, se fabricaron las nueve experimentales que contenían 69.0% de los ingredientes de la dieta de referencia, 30% del ingrediente probado y 1% de óxido de cromo como marcador inerte (las dietas contenían valores de proteína >35% y lípidos >6%).

6.4.1 Diseño experimental

Se emplearon cincuenta tinas de plástico (50 L), cubiertas con red para evitar el escape los peces. La temperatura del agua y el oxígeno disuelto se mantuvo a 27 ± 1 °C y $> 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente, con fotoperiodo de 14 h de luz: 10 h de oscuridad. Cinco juveniles (51.1 ± 11.6 g) por dieta. Las dietas experimentales fueron ofrecidas durante siete días antes de comenzar los ensayos, considerado periodo de adaptación, a partir de entonces, los peces fueron alimentados a las 08:00 y 16:00 h diariamente por 45 días hasta saciedad aparente. Las heces se recolectaban de cada tanque tres horas postprandiales usando un sifón (Jones y De Silva, 1997), después se lavaron, se liofilizaron y se almacenaron a -70 °C.

6.4.2 Coeficientes de digestibilidad

Los análisis del contenido de proteína y de óxido de cromo en las heces se realizaron de acuerdo con el método AOAC (1995) y Furukawa y Tsukahara (1966), respectivamente.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (ADC_{DM}) y proteína (ADC_{CP}) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones descritas por Maynard *et al.* (1981).

$$\%ADCDM = 100 - 100 \times \left(\frac{\%Cr \text{ dieta}}{\%Cr \text{ heces}} \right)$$

$$\%ADCCP = 100 - 100 \times \left(\frac{\%Cr \text{ dieta}}{\%CP \text{ dieta}} \times \frac{\%CP \text{ heces}}{\%Cr \text{ heces}} \right)$$

Donde Cr es la concentración de óxido de cromo y CP el contenido de proteína.

La digestibilidad de los ingredientes (ADC_{IDM}) y proteína de los ingredientes (ADC_{ICP}) fue determinada de acuerdo a las ecuaciones descritas por Cho y Slinger (1979).

$$\%ADCIDM = \frac{(100 \times \%ADCDM \text{ de DP}) - ((100 - \%IP) \times \%ADCDM \text{ de RD})}{\%IP}$$

$\%ADCICP$

$$= \frac{(100 \times \%ADCCP \text{ de DP} \times CP \text{ en DP}) - ((100 - \%IP) \times \%ADCCP \text{ de DR} \times \%CP \text{ en DR})}{\%IP \times \%CP \text{ en IP}}$$

Donde ADC_{IDM} es el coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca del ingrediente, ADC_{DM} de DP es la digestibilidad aparente de la dieta prueba, IP es el ingrediente prueba y ADC_{DM} de RD es la digestibilidad aparente de la dieta de referencia.

ADC_{ICP} es la digestibilidad aparente de la proteína del ingrediente, ADC_{CP} de DP es la digestibilidad aparente de la dieta prueba, CP en DP es la concentración de

proteína en la dieta prueba, IP es el ingrediente prueba, ADC_{CP} de RD es la digestibilidad aparente de la proteína de la dieta de referencia, CP en RD es la concentración de proteína en la dieta de referencia y CP en IP es la concentración de proteína en el ingrediente prueba.

6.4.3 Análisis estadísticos

La normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante el análisis de Bartlett y Lilliefors (Sokal y Rohlf, 1995). ANOVA de una vía y pruebas de rangos múltiples de Tukey se utilizaron para detectar diferencias en los valores medios entre las dietas e ingredientes (software Statistica 7.0, Statsoft, Tulsa, OK). La significancia se estableció en $P < 0.05$ para todos los análisis.

6.5 Experimento IV. Ensayos de crecimiento con dietas que incluyen subproductos agroindustriales

6.5.1 Preparación de dietas

Se diseñaron 10 dietas experimentales, una como dieta control y nueve que contenían 85% de la dieta control y 15% de cada ingrediente experimental (composición proximal, Tabla 4) las dietas fueron isocalóricas, en la Tabla 5 se muestra la formulación y composición química, determinada de acuerdo a la metodología de la AOAC (2005). Todas las dietas fueron extruidas (C.W. Brabender® Instruments, Inc.) y secadas a 45 °C para reducir la humedad hasta 10%.

6.5.2 Diseño experimental

El bioensayo de crecimiento se llevó a cabo en tinas de plástico rectangulares (80 × 58 × 58 cm) con capacidad de 180 L durante 60 días. Cinco juveniles (0.98 ± 0.3 g) por tanque fueron sembrados, con cuatro réplicas por tratamiento. Los peces fueron alimentados todos los días al 10% de la biomasa total, dividido en tres raciones (10:00, 14:00 y 18:00 h) la porción alimenticia se redujo de forma gradual hasta

terminar el bioensayo en 4% de biomasa. Los tanques experimentales se limpiaron cada semana y se realizó recambio parcial de agua del 50%. La temperatura del agua (28 ± 1 °C) y oxígeno disuelto (≥ 4 mg L⁻¹) fueron controlados sobre una base diaria.

El peso corporal (BW) y la longitud total (LT) de la tilapia se midieron cada diez días utilizando una balanza digital de precisión ± 0.01 g (Ohaus®, Parsippany, NJ, USA) y un vernier (0.00 mm), respectivamente. La tasa de crecimiento específico (SGR) se calculó: $SGR = [(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) \text{ día} / \text{cultivo}]$. Una vez concluidos los 60 días de cultivo, se utilizaron todos los organismos de cada tanque para calcular la eficiencia de alimentación, los índices somáticos, la composición bioquímica de la sangre y la actividad enzimática del sistema digestivo; por último, se determinó la composición química corporal.

6.5.3 Utilización del alimento e índices somáticos

La eficiencia del alimento se calculó utilizando fórmulas estándar: Aumento de peso (WG) = (peso final – peso inicial), factor de conversión alimenticia (FCR) = [consumo de alimento (g en peso seco) / ganancia de peso corporal (g, base del peso húmedo)], factor de eficiencia de alimentación (FER) = [WG/consumo de alimento WG (g en peso seco)] x 100, y el factor de eficiencia proteínica (PER) = [ganancia de peso neto (g, el peso seco) / proteína contenida en el alimento (g, base de materia seca)].

Se analizaron cuatro peces por tratamiento para determinar los índices hepatosomáticos (HSI) e intestinales (ISI) usando las siguientes fórmulas:

$HSI (\%) = [\text{peso húmedo de hígado (g)} / \text{peso húmedo para los peces (g)}] \times 100$;

$ISI (\%) = [\text{peso húmedo del intestino (g)} / \text{peso húmedo para los peces (g)}] \times 100$.

6.5.4 Parámetros sanguíneos

Una vez concluido el bioensayo, los animales tuvieron ayuno de 12 h y se colectó muestra de sangre de la vena caudal (n = 4 por dieta) en tubos BD® Vacutainer con heparina como anticoagulante. El hematocrito (HEM) se determinó de acuerdo con Goldenfarb *et al.* (1971). La glucosa (GLU), colesterol total (TCH) y los triglicéridos

(TG) se determinaron de acuerdo con Henry *et al.* (1974), Ellefson y Caraway (1976) y McGowan *et al.* (1983), respectivamente.

6.5.5 Actividad enzimática

Con ayuno de 24 horas se extrajo de la tilapia (n = 4 por tratamiento) el sistema digestivo, para determinar el efecto de la dieta en la actividad enzimática digestiva. Cada tejido se homogeneizó (Potter PRO 250®) en tres mL de agua destilada fría (4 °C) por g de tejido (1: 3 w / v). Todas las muestras se mantuvieron en hielo durante el proceso para evitar la desnaturalización y / o daño de la enzima. El homogeneizado se centrifugó (Eppendorf 5810R) dos veces durante 10 min a $15\,294 \times g$ y 4 °C, para eliminar el material insoluble de tejido.

La fracción lipídica flotante se retiró y el sobrenadante se recuperó y mantuvo a -20 °C hasta su uso. Esta fracción se consideró el extracto crudo (CE) (Vega-Villasante *et al.*, 1999).

La actividad de proteasas alcalinas, tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa esta descrita en la sección 6.1.3 (análisis de actividad enzimática).

Tabla 4. Composición química proximal de ingredientes usados en dietas para bioensayo de crecimiento de *O. niloticus*

	Ingredientes ¹								
	FS	WH	BB	RC	EB	EC	CM	JM	CH
Humedad	13.8±0.07	8.2±0.06	6.9±0.04	2.1±0.03	10.9±0.17	9.6±0.08	7.9±0.99	9.1±0.12	7.7±0.01
Proteína cruda	39.7±0.93	80.7±0.73	83.5±0.93	43.2±3.02	24.4±0.57	21.4±0.02	20.9±0.68	55.9±0.34	19.7±0.62
Lípidos	22.6±0.10	1.5±0.06	0.7±0.02	1.1±0.15	0.5±0.05	6.5±1.06	1.9±0.16	3.6±0.08	7.3±0.14
Cenizas	13.2±0.03	2.3±0.00	4.0±0.02	32.6±0.09	3.5±0.02	3.3±0.02	9.8±0.20	9.7±0.06	4.0±0.08
Fibra cruda	0.20±0.03	0.4±0.01	0.6±0.05	11.4±0.51	1.0±0.15	1.7±0.01	7.0±0.28	5.5±0.34	2.3±0.06
E.L.N.	24.4	15.1	11.2	11.7	70.5	67.2	60.3	25.4	66.8

NFE extracto libre de nitrógeno

Ingredientes: (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

Tabla 5. Dietas experimentales para ensayo de crecimiento por porcentaje de inclusión *O. niloticus*

Ingredientes	Dietas ¹									
	RD	FS	WH	BB	RC	EB	EC	CM	JM	CH
Harina de pescado	45.2	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
Celulosa	42.5	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2
Grenetina	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Aceite de pescado	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lecitina de soya	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Mezcal de vitaminas y minerales ²	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Ensilado de pescado	—	15.0	—	—	—	—	—	—	—	—
Suero lácteo	—	—	15.0	—	—	—	—	—	—	—
Sangre de bovino	—	—	—	15.0	—	—	—	—	—	—
Langostilla	—	—	—	—	15.0	—	—	—	—	—
Frijol extruido	—	—	—	—	—	15.0	—	—	—	—
Garbanzo extruido	—	—	—	—	—	—	15.0	—	—	—
Pasta de coco	—	—	—	—	—	—	—	15.0	—	—
Pasta de <i>J. curcas</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	15.0	—
Harina de garbanzo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15.0
Proteína cruda	27.4±0.9	29.7±0.9	30.8±0.4	30.7±0.4	28.0±1.3	26.0±0.1	25.3±0.6	24.4±0.5	28.7±0.6	21.5±1.4
Lípidos	10.0±0.0	11.8±0.6	8.4±0.1	8.8±0.1	10.3±0.1	9.1±0.0	9.9±0.1	10.1±0.1	9.0±0.0	9.3±0.9
Cenizas	9.6±0.0	9.7±0.0	8.5±0.0	8.9±0.0	12.5±0.1	8.6±0.3	8.7±0.1	9.2±0.2	9.2±0.0	8.7±0.0
Fibra cruda	20.2±2.4	17.8±0.0	20.0±0.3	17.9±1.9	18.7±1.0	16.0±1.4	20.8±0.2	20.6±1.0	16.6±0.6	21.0±0.4
E.L.N.	23.9	24.4	23.2	24.4	24.7	31.9	26.9	27.1	27.3	31.3
Energía (Kcal/g)	299.4	326.9	295.2	303.1	308.1	316.7	302.1	300.6	308.7	297.4

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 15% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (WH) suero lácteo; (BB) sangre de bovino; (RC) langostilla; (EB) frijol extruido; (EC) garbanzo extruido; (CM) pasta de coco; (JM) *J. curcas* y (CH) garbanzo.

6.5.6 Composición proximal corporal

Todos los peces cultivados se emplearon para determinar la composición corporal. Una vez cosechados, se des–visceraron, liofilizaron y molieron para analizar de acuerdo a la metodología descrita por la AOAC (2005) para determinar el contenido de proteínas, lípidos, cenizas y carbohidratos.

6.5.7 Análisis estadísticos

Los datos se analizaron por separado para las dietas que contienen subproductos animales y vegetales. La normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante el análisis de Bartlett y de Lilliefors (Sokal y Rohlf, 1995). ANOVA de una vía y pruebas de rangos múltiples de Tukey se utilizaron para detectar diferencias en los valores medios entre las dietas y los ingredientes probados. Entre los parámetros digestivos y las respuestas de crecimiento se realizaron análisis de regresión (software Statistica 7.0, Statsoft, Tulsa, OK). La significancia se estableció en $P < 0.05$ para todos los análisis.

6.6 Evaluación de la expresión de genes por RT–PCR

El objetivo fue analizar la expresión de genes hepáticos involucrados en el metabolismo de la tilapia alimentados con dietas (ver, 6.5.1 preparación de dietas, Tabla 5) basadas en proteína vegetal y animal, respecto a una dieta de referencia, que se diseñó con los requerimientos nutricionales de la tilapia, a partir de esta se incluyó un 15% de harina vegetal o animal, para determinar el efecto a nivel de expresión de genes.

6.6.1 Muestreo

El criterio de selección para la toma de muestras para los análisis de expresión de genes se basó en los resultados obtenidos en las pruebas de digestibilidad *in vivo* de los ingredientes experimentales, muestreando, el tratamiento que obtuvo mayor y menor coeficiente de digestibilidad de origen animal y vegetal, además del control. Las tilapias *O. niloticus* se obtuvieron del cultivo de crecimiento experimental, 24 horas postprandial, se tomó un pez de cada tina (se muestrearon tres tinas por tratamiento) y se disectó el hígado, el cual fue congelado inmediatamente en

nitrógeno líquido y mantenido a -70 °C hasta su procesamiento. Los peces fueron sacrificados sumergiéndolos en agua con hielo.

6.6.2 Extracción de RNA

Se extrajo RNA total de 50 mg de tejido usando TRIzol® Reagent (Invitrogene, No. de catálogo 15596018) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total obtenido fue tratado con DNAsa y cuantificado espectrofotométricamente en un NanoDrop. La integridad del RNA total fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa 1.2% a 100 mV por 40 min.

6.6.3 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA fue llevada a cabo a partir de 2 µg de RNA total usando el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, no. Cat. 18064–014) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop.

6.6.4 Selección de genes asociados al metabolismo de nutrientes (oligonucleótidos)

La expresión de los genes Sintasa de ácidos grasos o FASN (por sus siglas en inglés Fatty Acid Synthase) y Factor de crecimiento del tipo insulina 1 o IGF-1 (por sus siglas en inglés Insuline–like growth factor 1) fue analizada por PCR cuantitativa. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Genes de interés

ID	Nombre oligos	Anotación	Secuencia 5'3'	Tamaño pb	Referencia
1	FASN-F	Fatty acid synthase	TGAAACTGAAGCCTTGTGTGCC	22	Xiong <i>et al.</i> , 2014
2	FASN-R	Fatty acid synthase	TCCCTGTGAGCGGAGGTGATTA	22	
7	IGF1-F	Insuline-like growth factor 1	GTCTGTGGAGAGCGAGGCTTT	21	Vera Cruz <i>et al.</i> , 2006
8	IGF1-R	Insuline-like growth factor 1	CACGTGACCGCCTTGCA	17	

Tabla 7. Genes normalizadores

9	UBCE-S1	Ubiquitin-conjugating enzyme	CTCTCAAATCAATGCCACTTCC	22	Yang <i>et al.</i> , 2013
10	UBCE-A1	Ubiquitin-conjugating enzyme	CCCTGGTGGAGGTTTCCTTGT	20	
11	18S rRNA-S1	18S ribosomal RNA	GGACACGGAAAGGATTGACAG	21	
12	18S rRNA-A1	18S ribosomal RNA	GTTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC	24	

6.6.5 PCR en punto final y cuantitativa

Las reacciones de PCR en punto final se llevaron a cabo en un volumen final de 12.5 μ L con la siguiente mezcla de reacción: 1X buffer de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Cat. No. 10342-053) 200 nM (concentración final de cada oligonucleótido), 2 mM de $MgCl_2$, 0.2 U de Taq DNA polimerasa y 100 ng de cDNA. El programa de amplificación fue el siguiente: un paso inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de un paso a 95 °C por 30 s, 57 °C por 30 s (para los genes FASN e IGF-1) y 52 °C por 30 s (para los genes UBCE y 18sRNA), y un paso de amplificación a 72 °C por 30 s. Después de los 35 ciclos se dio un paso final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa 1.2%, visualizado y documentado en un fotodocumentador bajo luz UV.

Las reacciones de PCR cuantitativo se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ L con la siguiente mezcla de reacción: 5 μ L de SYBR GREEN PCR Master Mix (Qiagen, # cat. 204074), 1 μ L de cada oligonucleótido (concentración final 200 nM) y 100 ng de cDNA.

Se emplearon dos genes normalizadores, el UBCE (Ubiquitin-conjugating enzyme) y el 18S rRNA-S1 (18S ribosomal RNA). Los oligonucleótidos utilizados se presentan en la Tabla 7.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real Rotor-Gene Q (Qiagen) usando el software Rotor-Gene Q-Pure detector versión 1.7 (Qiagen) para la obtención de los datos. Las condiciones de corrida de PCR para los genes FASN e IGF-1 fueron un paso de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min y posteriormente 45 ciclos de los pasos: 95 °C por 5 s, 57 °C por 10 s, mientras que para los genes UBCE y 18sRNA, las condiciones fueron: 95 °C por 5 min, 45 ciclos a 95 °C por 5 s, 52 °C por 10 s y para ambos un paso final de 72 °C por 10 s. En todos los casos se llevó a cabo la variación ascendente de la temperatura con el objetivo de obtener las curvas de disociación para cada gen.

La expresión relativa de cada gen se calculó mediante la función $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método presentado por PE Applied Biosystems [Perkin Elmer, Foster City, CA]), previa determinación de la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de los

pares de oligonucleótidos utilizados. La eficiencia calculada sustituirá el valor de “2” de la función descrita.

6.6.6 Determinación de la expresión relativa

El método de la determinación de expresión relativa $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (método delta–delta), se trata de un modelo matemático para comparar resultados de expresión relativa entre tratamientos (Pfaffl, 2001), cuya ecuación se expresa de la sig. manera:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-[\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}]}$$

$\Delta Ct_{\text{muestra experimental}} = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen normalizador}}$, obtenidos de la amplificación de la muestra experimental

$\Delta Ct_{\text{muestra control}} = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen normalizador}}$, obtenidos de la amplificación de la muestra control.

La cuantificación relativa se basa en determinar la expresión de un gen en función de la expresión de un gen normalizador en una condición problema con respecto a una condición de referencia o control (Pfaffl, 2001).

Los valores de eficiencia fueron obtenidos mediante la fórmula $E=10^{-1/\text{pendiente}}$. Para obtener la pendiente se obtienen los Ct de determinado gen a diferentes concentraciones cDNA y se grafica el log de la concentración de cDNA vs el Ct correspondiente, a partir de esta curva se calcula la pendiente y se sustituye en la ecuación presentada arriba. Valores de E entre 1.90 y 2.05 son considerados adecuados (Bio-Rad, 2006).

7. RESULTADOS

7.1 Experimento I. Ensayo de ciclo circadiano en estado basal y con estímulo alimenticio

7.1.1 Actividad enzimática

La secreción de proteasas acidas (tipo pepsina) aumentó de manera lineal conforme las horas del día (Fig. 1). La actividad de las proteasas alcalinas, tripsina y amilasas disminuyó en las primeras horas de la mañana y tuvo un pico de máxima actividad en la noche (Fig. 2 y 3); en contraste, la actividad de quimotripsina, no se vio afectada por las fases de luz y oscuridad y la actividad de lipasa disminuyó durante el mediodía (Fig. 4). En la tilapia con alimentación *ad libitum*, se observó aumentada la actividad de pepsina con un pico secundario en la mañana y un pico principal en la noche (Fig. 1); las proteasas alcalinas, tripsina, quimotripsina, y amilasas mantuvieron una alta actividad en la mayoría de las horas, con una ligera disminución al mediodía (Fig. 2 y 3).

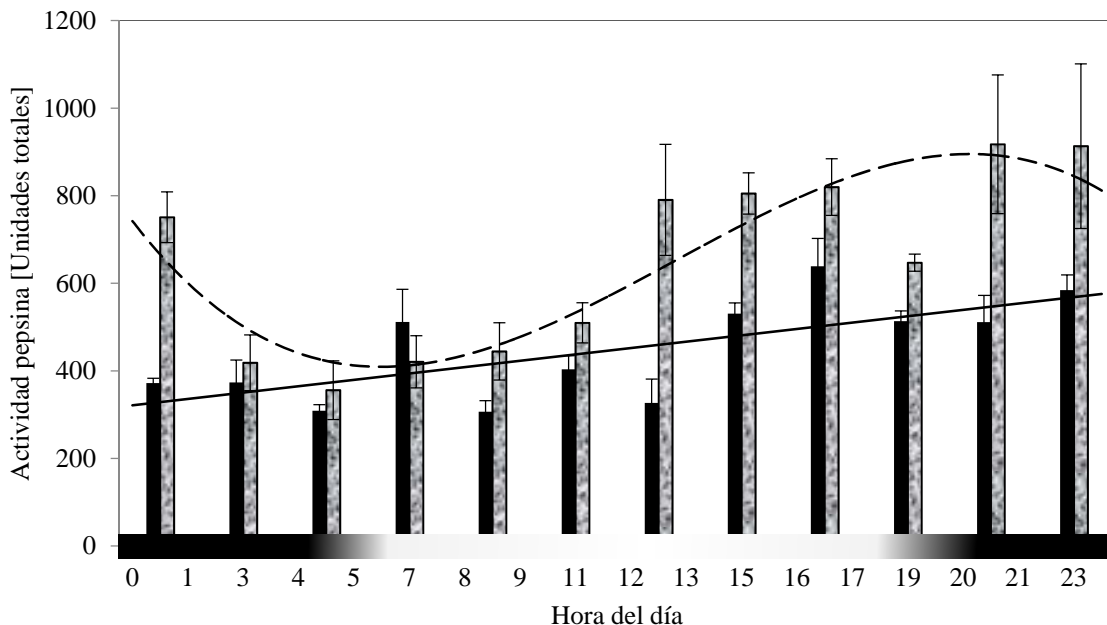
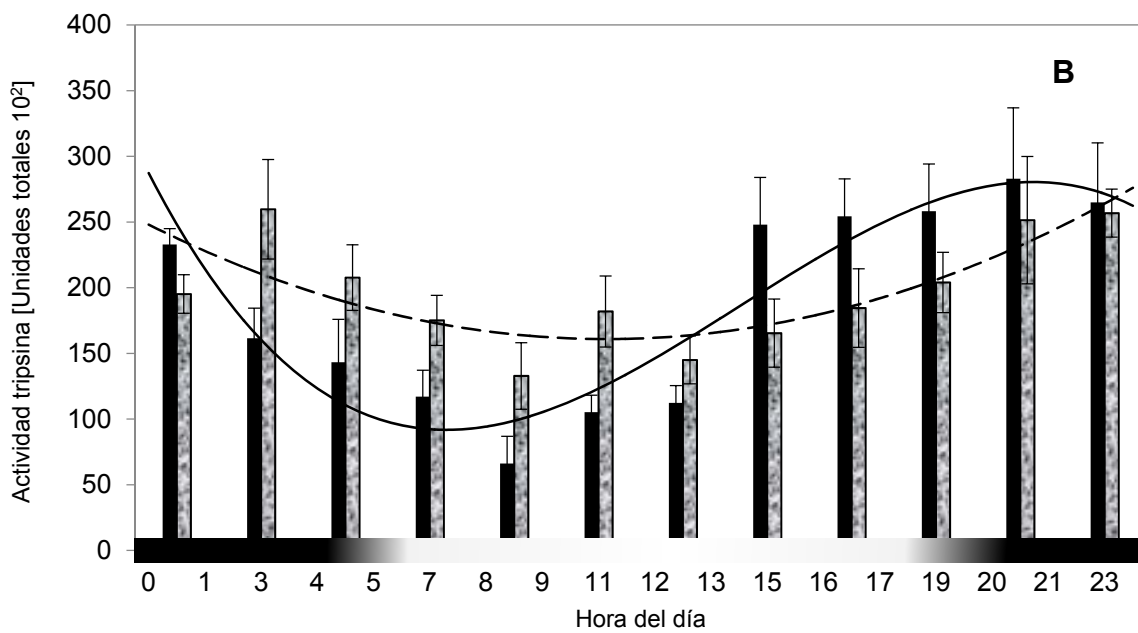
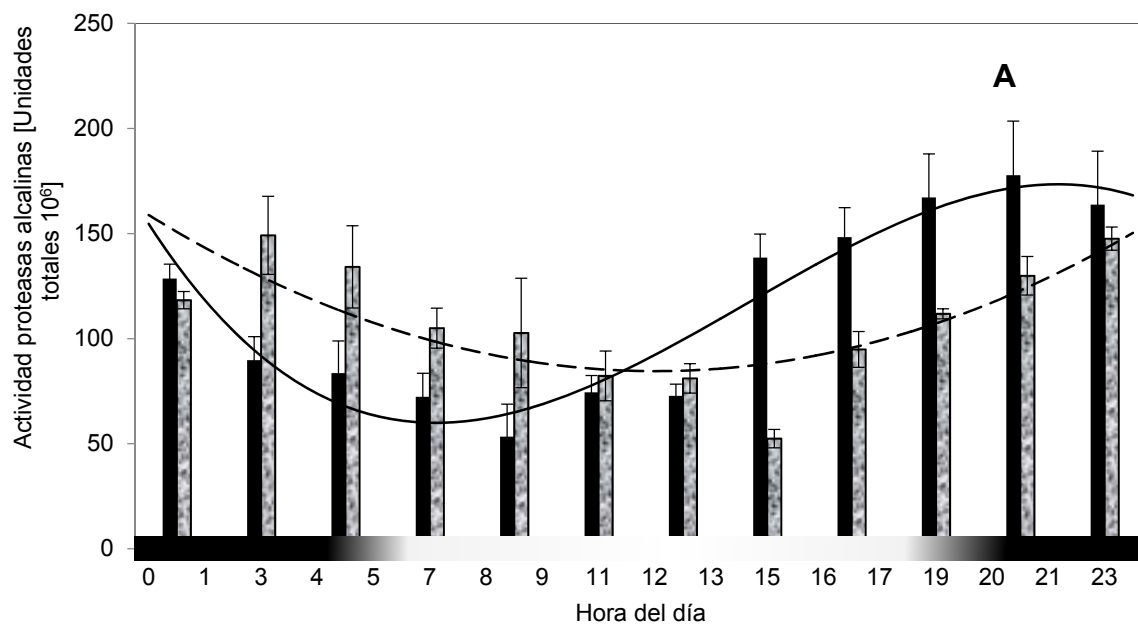


Figura 1. Actividad tipo pepsina en tilapia, *O. niloticus*; barras negras representan actividad basal (animales en ayuno) con línea continua ($P < 0.05$); barras marmoleadas con líneas punteadas representan la condición de alimentación *ad libitum* ($P < 0.05$); la sección negra de la barra inferior representa la noche. Valores promedios \pm desviación estándar.



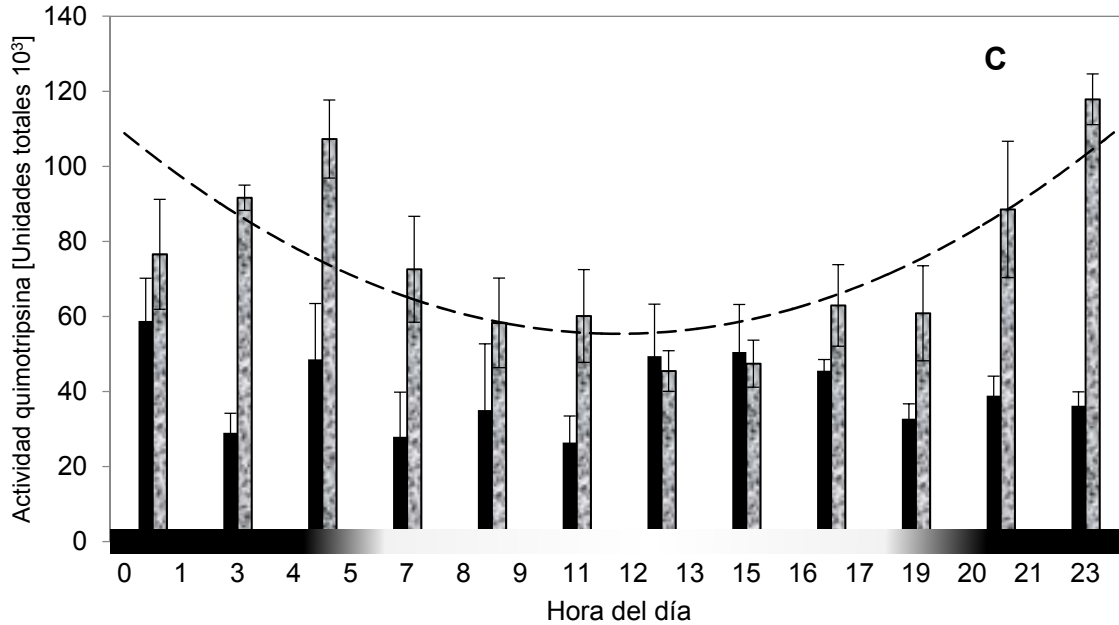


Figura 2. Actividad de proteasas alcalinas en la tilapia, *O. niloticus*, bajo ayuno y alimentación *ad libitum* (A); Actividad tipo tripsina (B); Actividad quimotripsina (C). Las barras negras representan la actividad de la enzima digestiva basal (peces en ayuno) y las barras marmoleadas, representan la actividad de las enzimas de la tilapia alimentada *ad libitum*; la línea continua representa el patrón de secreción en condiciones basales y la línea discontinua representa el patrón de enzimas en condiciones *ad libitum* ($P < 0.05$); la sección negra de la barra inferior representa la noche. Valores promedios \pm desviación estándar.

7.1.2 Comportamiento

La actividad enzimática se resume en la Tabla 8. Los picos de actividad enzimática en el intestino, aparecieron a las 18:43:48 h para amilasas, 19:57:36 h para proteasas y 20:29:24 h para la tripsina; la mínima actividad se observó desde las 04:51:00 h para amilasas hasta 10:13:12 h para lipasas.

En condiciones de alimentación, en el estómago (pepsina) se alcanzó la máxima actividad a las 20:06:00 h y la mínima a las 05:46:12 h. La actividad enzimática digestiva en el intestino solo presentó un largo período de baja actividad a partir de las 05:46:12 h concluyendo hasta las 12:58:48 h para la actividad de amilasa.

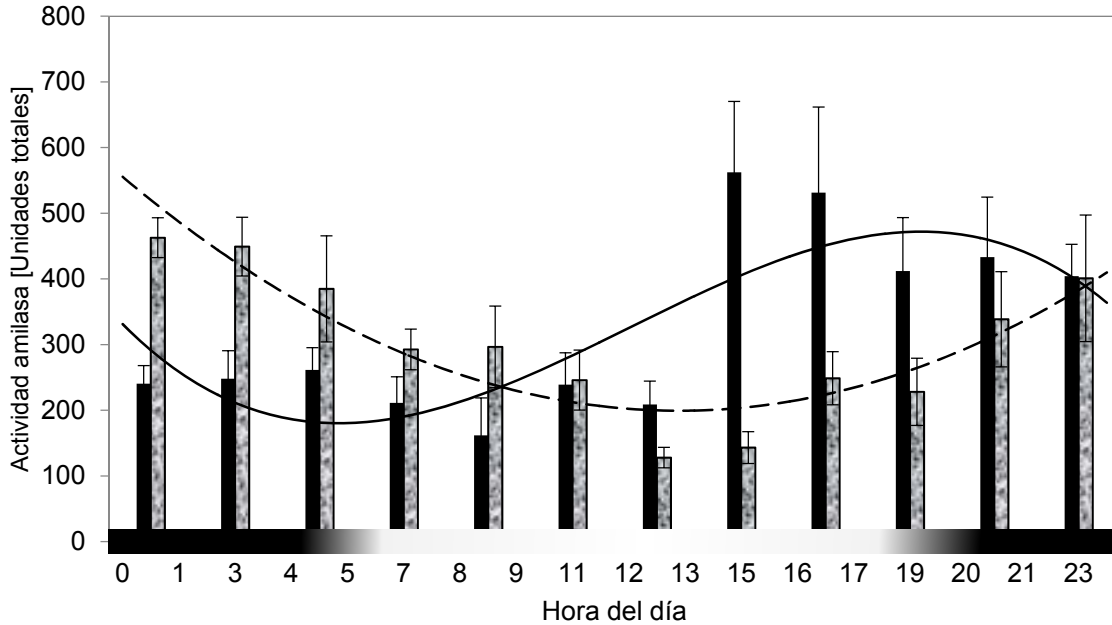


Figura 3. Actividad amilasa en tilapia, *O. niloticus*; barras negras representan actividad basal (animales en ayuno) con línea continua ($P < 0.05$); barras marmoleadas con líneas punteadas representan la condición de alimentación *ad libitum* ($P < 0.05$); la sección negra de la barra inferior representa la noche. Valores promedios \pm desviación estándar.

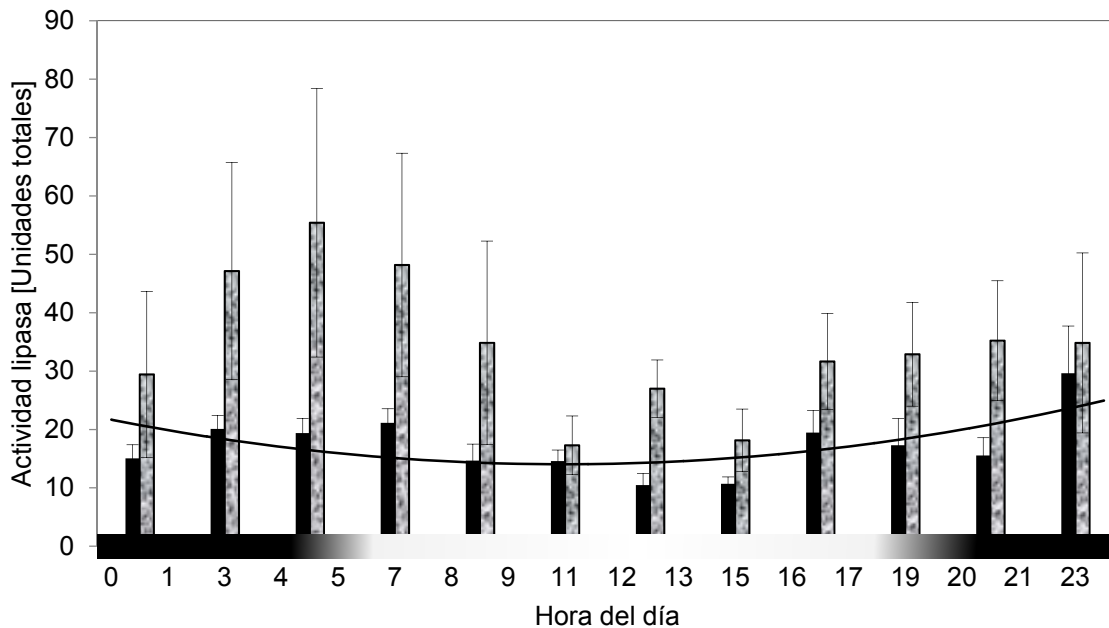


Figura 4. Actividad lipasa en tilapia, *O. niloticus*; barras negras representan actividad basal (animales en ayuno) con línea continua ($P < 0.05$); barras marmoleadas representan la condición de alimentación *ad libitum* ($P < 0.05$); la sección negra de la barra inferior representa la noche. Valores promedios \pm desviación estándar.

Tabla 8. Comportamiento de las enzimas digestivas durante el ciclo circadiano de la tilapia, *O. niloticus*

Fuente de enzima	Enzima	Condición	Ecuación	P	Puntos de inflexión	
					Max	Min
Estómago	Pepsina	Inanición	$y = 10.527x + 326.53$	0.000003		
		<i>Ad libitum</i>	$y = -0.3532x^3 + 13.706x^2 - 122.9x + 720.98$	0.002000	20:06:00	05:46:12
Intestino	Proteasas	Inanición	$y = -75105x^3 + 3 \times 10^6x^2 - 3 \times 10^7x + 1 \times 10^8$	0.000060	19:57:36	06:40:12
		<i>Ad libitum</i>	$y = 502560x^2 - 1 \times 10^7x + 2 \times 10^8$	0.000006		09:57:00
	Tripsina	Inanición	$y = -14.331x^3 + 585.88x^2 - 5958.9x + 27192$	0.000100	20:29:24	06:45:36
		<i>Ad libitum</i>	$y = 70.118x^2 - 1495x + 24224$	0.000400		10:39:36
	Quimotripsina	Inanición				
		<i>Ad libitum</i>	$y = 377.3x^2 - 8673.9x + 105840$	0.000020		11:29:24
	Amilasas	Inanición	$y = -0.214x^3 + 7.5695x^2 - 58.317x + 308.64$	0.009000	18:43:48	04:51:00
		<i>Ad libitum</i>	$y = 2.0381x^2 - 52.917x + 540.82$	0.000000		12:58:48
Lipasas	Inanición	$y = 0.0748x^2 - 1.5284x + 21.353$	0.006000		10:13:12	
	<i>Ad libitum</i>					

7.2 Digestibilidad *in vitro*

La actividad enzimática del extracto ácido y alcalino fueron $43.06 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($397.82 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) y $45.19 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($78.10 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), respectivamente.

Las cantidades de aminoácidos libres (en equivalentes de leucina) en las dietas experimentales antes de la digestión ácida, tiempo cero eran de 193.2 (FS) a 121.9 (CM) $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente; y en los ingredientes prueba, desde 361.0 (RI) a 26.8 (CM) $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente.

Los resultados de digestibilidad ácida, como aminoácidos liberados de las dietas experimentales fueron de 69.9 (WH) a 29.2 (CH) $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente; y en relación con la digestibilidad alcalina fueron de 113.8 (BB) hasta 26.0 (EB) $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente. Por otro lado, respecto a los ingredientes probados, la digestibilidad ácida como aminoácidos liberados de 101.9 (WH) a 17.2 (CH) $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente; y por digestibilidad alcalina de 589.6 (BB) a 13.7 (RC) $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente (Tabla 9).

En general, las dietas que incluyen ingredientes de origen animal tuvieron valores más altos de digestibilidad que la dieta de referencia ($P < 0.05$), la dieta más hidrolizada incluye suero de leche (WH) (Fig. 5). Las dietas que incluyen ingredientes de origen vegetal eran digeridas como la dieta de referencia, excepto CM y JM, que eran más hidrolizadas que todos ($P < 0.05$) (Fig. 6). Los ingredientes de origen animal con mayor digestibilidad fueron BB y WH, en cambio RC y FS fueron igual a RI ($P < 0.05$) (Fig. 7). Todos los ingredientes vegetales tienen menores valores de digestibilidad que el ingrediente de referencia (RI) ($P < 0.05$). JM tenía la más alta y CH la digestibilidad más baja ($P < 0.05$) (Fig. 8).

Tabla 9. Valores equivalentes de leucina en la digestión *in vitro*

Leucina liberada ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ingrediente)

Dieta ¹	Acumulada			Por fase de digestión		
	t=0	Post-ácida	Post- alcalina	Ácida	Alcalina	Total
RD	157.1±2.2 ^{bc}	200.2±2.1 ^{bc}	236.0±7.2 ^{cde}	43.1±2.1 ^{cd}	35.8±7.2 ^{cd}	79.0±7.2 ^d
FS	193.2±12.8 ^a	251.5±2.2 ^a	314.4±1.9 ^b	58.3±2.2 ^{ab}	62.9±1.9 ^{bc}	121.2±1.9 ^{bc}
RC	148.8±1.4 ^{bcd}	191.8±2.7 ^c	263.4±5.2 ^c	43.0±2.7 ^{cd}	71.6±5.2 ^b	114.6±5.2 ^c
BB	173.9±2.4 ^{ab}	212.4±4.8 ^b	326.2±13.9 ^b	38.5±4.8 ^{cd}	113.8±13.9 ^a	152.3±13.9 ^{ab}
WH	192.7±1.5 ^a	262.6±2.3 ^a	373.2±3.4 ^a	69.9±2.3 ^a	110.6±3.4 ^a	180.5±3.4 ^a
EC	127.9±1.6 ^{cd}	170.9±2.8 ^d	209.9±3.5 ^f	43.0±2.8 ^{cd}	39.0±3.5 ^{cd}	82.0±3.5 ^d
CH	145.9±3.3 ^{bcd}	175.1±4.2 ^d	214.6±2.2 ^f	29.2±4.2 ^d	39.5±2.2 ^{cd}	68.7±2.2 ^d
EB	133.2±1.9 ^{cd}	197.4±2.9 ^c	223.4±4.9 ^{de}	64.1±2.9 ^{ab}	26.0±4.9 ^d	90.1±4.9 ^{cd}
CM	121.9±2.7 ^d	174.1±3.1 ^d	223.9±1.4 ^{de}	52.3±3.1 ^{bc}	49.8±1.4 ^{bcd}	102.1±1.4 ^{cd}
JM	133.2±5.1 ^{cd}	177.1±2.0 ^d	251.2±5.1 ^{cd}	43.9±2.0 ^{cd}	74.0±5.1 ^b	117.9±5.1 ^c
Ingrediente²						
RI	361.0±4.8 ^a	420.7±2.8 ^a	663.4±11.8 ^b	59.6±2.8 ^{cd}	242.7±11.8 ^c	302.3±11.8 ^{bc}
FS	255.1±1.8 ^d	330.6±4.2 ^c	494.8±9.1 ^c	75.5±4.2 ^{bc}	164.3±9.1 ^d	239.7±9.1 ^{bc}
RC	102.5±1.3 ^e	180.6±4.5 ^d	194.3±0.0 ^{de}	78.0±4.5 ^b	13.7±0.0 ^e	91.8±0.0 ^{cd}
BB	271.3±3.2 ^c	323.0±2.8 ^c	912.7±35.6 ^a	51.8±2.8 ^{de}	589.6±35.6 ^a	641.4±35.6 ^a
WH	295.1±3.5 ^b	397.0±10.4 ^b	889.4±25.1 ^a	101.9±10.4 ^a	492.4±25.1 ^b	594.3±25.1 ^a
EC	97.8±4.6 ^e	126.3±2.2 ^f	159.8±2.3 ^e	28.5±2.2 ^{fg}	33.5±2.3 ^e	62.0±2.3 ^d
CH	99.8±1.5 ^e	117.1±0.6 ^f	133.6±1.9 ^e	17.2±0.6 ^g	16.5±1.9 ^e	33.7±1.9 ^d
EB	83.3±2.0 ^f	120.4±1.5 ^f	140.0±3.1 ^e	37.1±1.5 ^{ef}	19.6±3.1 ^e	56.8±3.1 ^d
CM	26.8±0.3 ^g	54.1±0.7 ^g	111.0±2.6 ^e	27.3±0.7 ^{fg}	56.9±2.6 ^e	84.2±2.6 ^d
JM	106.4±1.1 ^e	155.4±1.8 ^e	277.1±4.2 ^d	49.0±1.8 ^{de}	121.6±4.2 ^d	170.6±4.2 ^c

Los promedios en la misma columna que no comparten una letra común son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 30% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

Notas: ² Ingredientes: (RI) Referencia (harina de pescado); (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

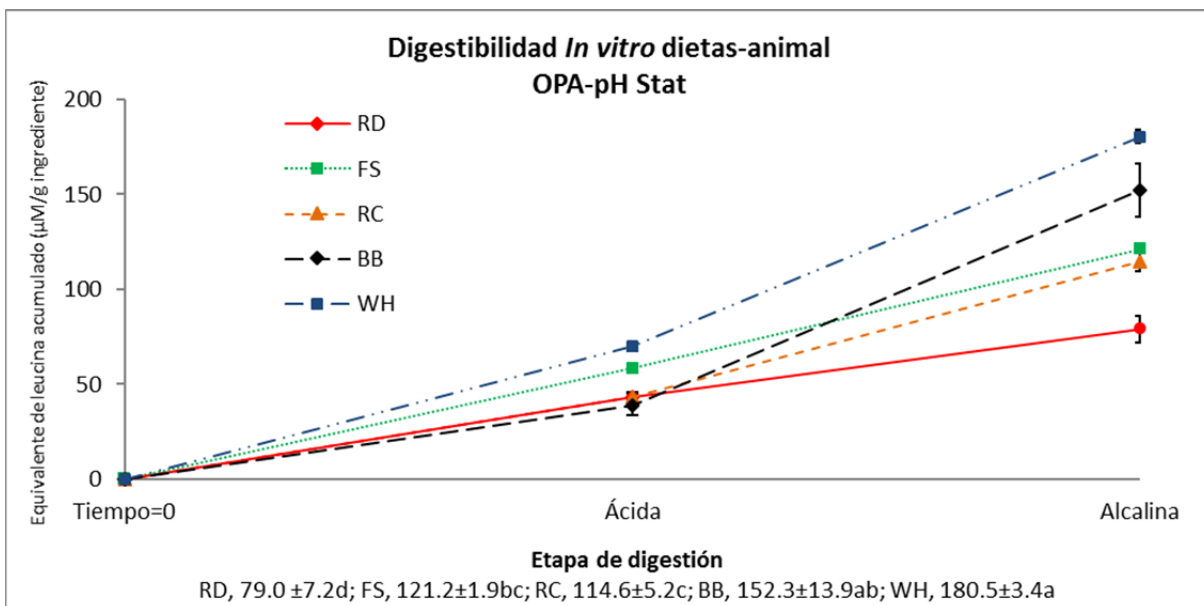


Figura 5. Digestibilidad *in vitro* de las dietas que incluyen ingredientes de origen animal en tilapia (*O. niloticus*). Dietas (en todas las dietas se incluyó el 30% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino y (WH) suero lácteo.

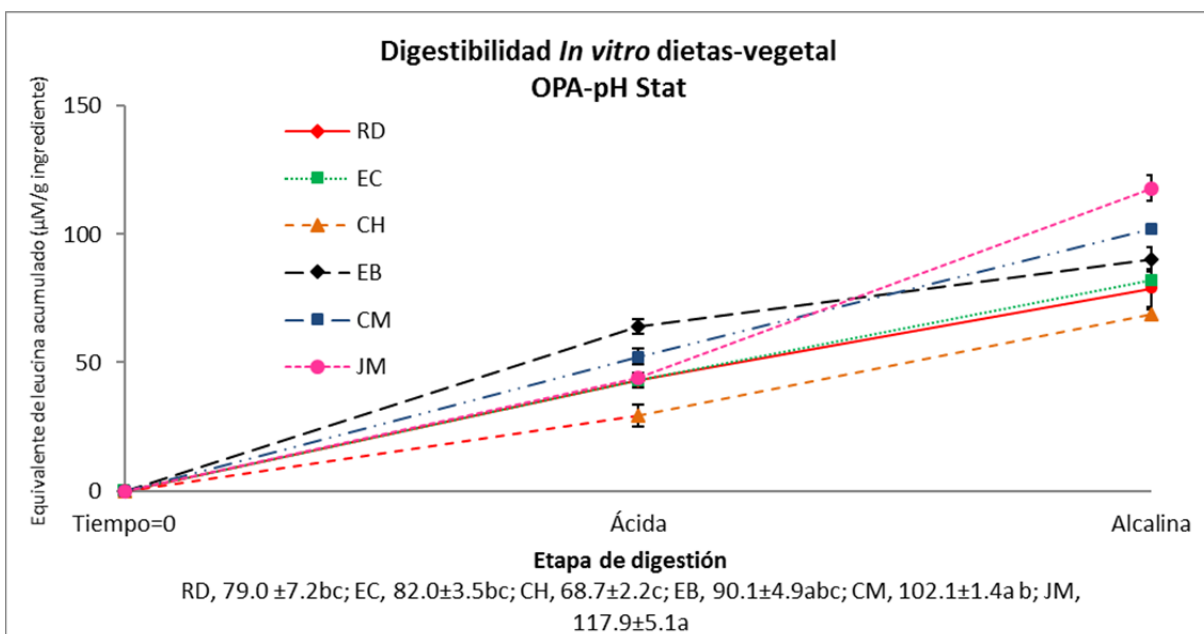


Figura 6. Digestibilidad *in vitro* de las dietas que incluyen ingredientes vegetales en tilapia (*O. niloticus*). Dietas (en todas las dietas se incluyó el 30% de ingrediente): (RD) Referencia; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

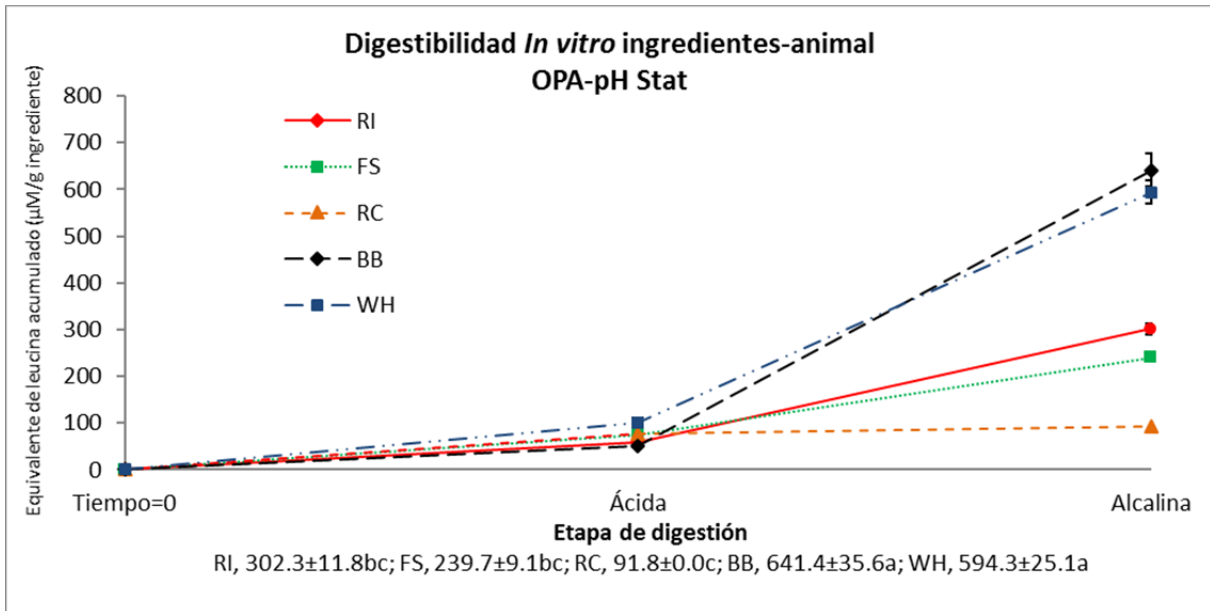


Figura 7. Digestibilidad *in vitro* de ingredientes de origen animal en tilapia (*O. niloticus*). Ingredientes: (RI) Referencia (harina de pescado); (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino y (WH) suero lácteo.

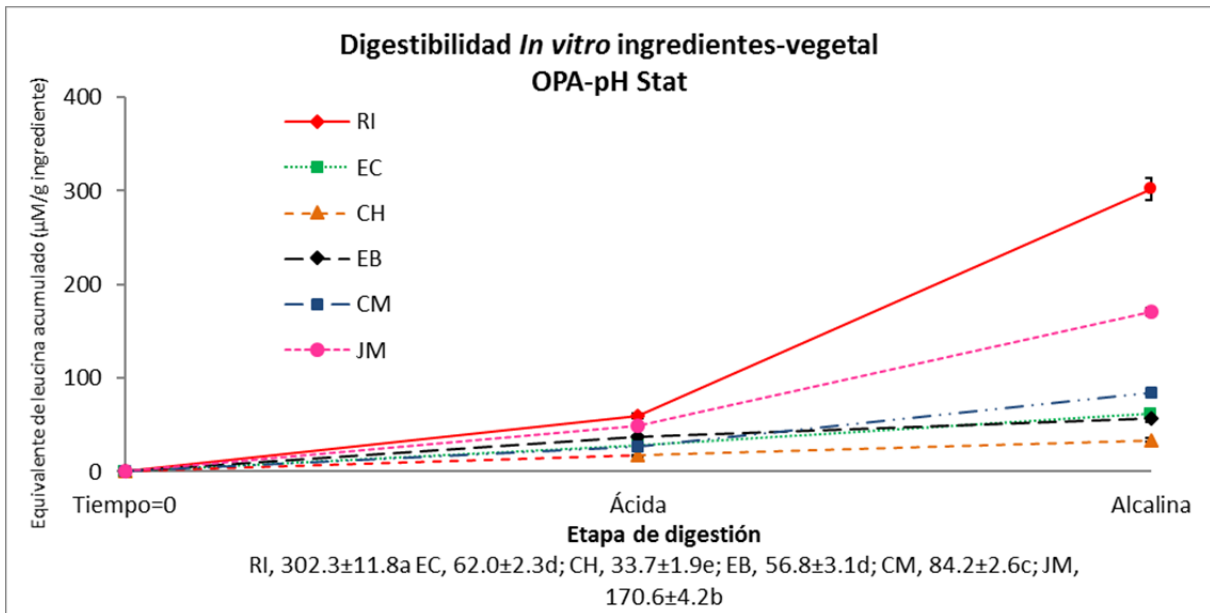


Figura 8. Digestibilidad *in vitro* de ingredientes vegetales en tilapia (*O. niloticus*). Ingredientes: (RI) referencia (harina de pescado); (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

7.3 Experimento II. Ensayos de crecimiento a horarios de alimentación circadiana

Al final del bioensayo no se obtuvieron diferencia entre los horarios de alimentación, sin embargo, se observa un periodo de adaptación de los organismos. Menor crecimiento en la biometría 4 para el tratamiento 3 (Fig. 9; $P = 0.0163$).

Se alcanzó talla comercial en todos los tratamientos. Los parámetros de crecimiento SGR y FCR no presentaron diferencias significativas. El peso final y ganancia en peso, de todos los horarios experimentales fue similar (Tabla 10).

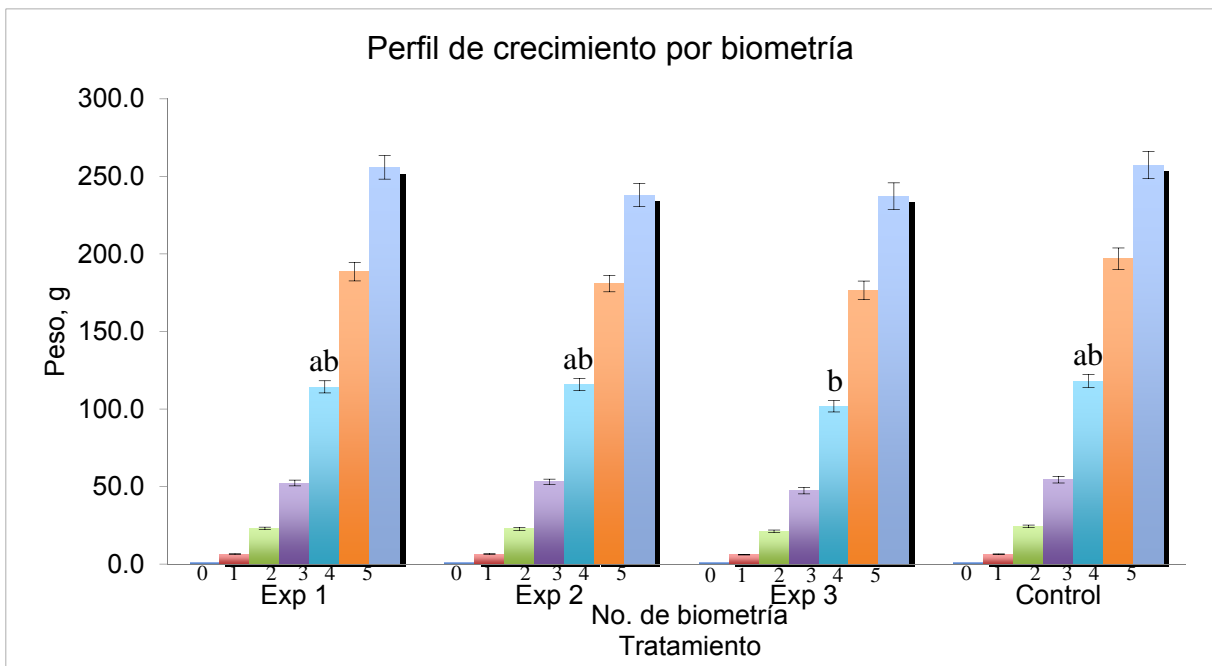


Figura 9. Perfil de crecimiento en horarios de alimentación circadiana en tilapia (*O. niloticus*).

Tabla 10. Resumen del bioensayo de crecimiento a horarios de alimentación circadiana

Horario	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia en peso (g)	SGR	FCR
1	1.4 ± 0.08 ^a	253.5 ± 24.5 ^a	252.1 ± 24.45 ^a	5.8 ± 0.08 ^a	1.3 ± 0.08 ^a
2	1.4 ± 0.11 ^a	237.2 ± 13.24 ^a	235.8 ± 13.27 ^a	5.7 ± 0.12 ^a	1.3 ± 0.05 ^a
3	1.3 ± 0.06 ^a	229.9 ± 15.02 ^a	228.6 ± 14.99 ^a	5.7 ± 0.06 ^a	1.3 ± 0.06 ^a
4	1.4 ± 0.03 ^a	257.6 ± 15.00 ^a	256.2 ± 15.03 ^a	5.8 ± 0.08 ^a	1.3 ± 0.08 ^a

Distinta letra en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

7.4 Experimento III. Ensayos de digestibilidad *in vivo*

Los valores promedios de ADC_{DM} de las dietas y los ingredientes mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre cada grupo de subproductos (Tabla 11).

La dieta de referencia, obtuvo los valores más elevados de ADC_{DM} y ADC_{CP} respecto a las dietas que incluían subproductos de origen animal (83.7 y 93.0, respectivamente). Sin presentar diferencias significativas con FS (78.9 y 92.2, respectivamente.) y WH (78.8 y 93.6, respectivamente).

Del mismo modo, FS y WH fueron los ingredientes más digeridos (ADC_{IDM} , 79.7 y 80.4, respectivamente), además contenían la proteína más digestible por la tilapia (ADC_{ICP} 82.6 y 89.3, respectivamente).

Para las dietas con subproductos de origen vegetal, los valores ADC_{DM} y ADC_{CP} más altas también se mostraron por el grupo RD ($P < 0.05$), siendo comparable con EB (78.9 y 90.5, respectivamente). ADC_{IDM} y ADC_{ICP} coeficientes subproductos vegetales fueron diferentes ($P < 0.05$), los valores más elevados fueron de 67.8 (EB) y 92.0 (EC) respectivamente.

Tabla 11. Digestibilidad aparente de materia seca (ADC_{DM}) y proteína (ADC_{CP}) y materia seca de los ingredientes (ADC_{IDM}) y proteína (ADC_{ICP}) de las dietas experimentales para *O. niloticus*

Dietas ¹	ADC _{DM} ²	ADC _{IDM} ³	ADC _{CP} ⁴	ADC _{ICP} ⁵
<i>Subproductos animales</i>				
FS	78.9 ± 5.1 ^{ab}	79.7 ± 5.9 ^a	92.2 ± 1.6 ^a	82.6 ± 5.5 ^a
WH	78.8 ± 6.8 ^{ab}	80.4 ± 13.4 ^a	93.6 ± 1.0 ^a	89.3 ± 2.2 ^a
BB	72.9 ± 5.9 ^b	50.3 ± 17.5 ^b	74.6 ± 5.1 ^c	47.1 ± 9.4 ^b
RC	62.9 ± 7.8 ^c	28.7 ± 8.6 ^c	83.9 ± 1.6 ^b	25.2 ± 4.7 ^c
RD	83.7 ± 3.9 ^a		93.0 ± 2.0 ^a	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Subproductos vegetales</i>				
EB	78.9 ± 4.8 ^a	67.8 ± 16.1 ^a	90.5 ± 1.7 ^{ab}	69.6 ± 8.8 ^c
EC	78.1 ± 1.1 ^{ab}	64.8 ± 3.8 ^a	90.5 ± 0.8 ^{ab}	92.0 ± 4.8 ^a
CM	71.3 ± 5.4 ^{cd}	53.0 ± 9.7 ^{ab}	90.4 ± 2.4 ^b	84.4 ± 14.4 ^{ab}
JM	73.0 ± 1.7 ^{bc}	47.9 ± 5.6 ^b	87.9 ± 0.7 ^{bc}	37.7 ± 2.0 ^d
CH	66.6 ± 4.7 ^d	33.2 ± 10.3 ^c	86.9 ± 2.3 ^c	75.2 ± 13.6 ^{bc}
RD	83.7 ± 3.9 ^a		93.0 ± 2.0 ^a	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Promedio ± desviación estándar. Distinta letra por columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 30% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

²Coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca de la dieta

³Coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca del ingrediente

⁴Coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda de la dieta

⁵Coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda del ingrediente

7.5 Experimento IV. Ensayos de crecimiento

7.5.1 Variables de crecimiento, eficiencia alimenticia e índices somáticos

Los parámetros de crecimiento, la eficiencia alimenticia y los índices somáticos se muestran en la Tabla 12. No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en el FBW de los peces alimentados con dietas que contenían ambos subproductos. Se obtuvieron los valores más altos de FBW para RC (23.30 g) y EC (23.60 g) de cada grupo. La PER para los subproductos animales osciló entre 1.9 para los grupos de FS y RC a 1.5 para el tratamiento BB ($P < 0.05$). El resto de los parámetros de crecimiento fueron similares ($P > 0.05$) entre cada grupo de subproductos.

7.5.2 Parámetros sanguíneos y actividad enzimática digestiva

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores de HEM entre todas las dietas, mientras que GLU, TCH y TG variaron significativamente ($P < 0.05$; Tabla 13). En los tratamientos con subproductos animales, las concentraciones de GLU y TG en sangre fueron significativamente mayores para las dietas de FS (138.0 y 389.0 mg · dL⁻¹, respectivamente) y WH (174.5 y 284.0 mg · dL⁻¹, respectivamente). Para los tratamientos con subproductos de origen vegetal, la concentración de GLU fue significativamente mayor cuando se utilizó JM (130.3 mg · dL⁻¹). La dieta CM resultó con la mayor concentración TCH (254.0 mg · dL⁻¹) en la sangre, en comparación a la dieta CH (182.0 mg · dL⁻¹). Asimismo, la dieta CM también se registró la más alta concentración de TG (304.0 mg · dL⁻¹).

Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad enzimática entre todas las dietas (Tabla 14). Para los tratamientos con subproductos animales, el grupo FS presentó la mayor actividad de las enzimas (proteasa = 171.3 UT, tripsina = 20806.6 UT, quimotripsina = 128509.7 UT, amilasa = 116.5 UT y lipasa = 19.0 UT). En los tratamientos con subproductos vegetales, el grupo CM muestra los valores más altos para la tripsina (16381.3 UT) y lipasa (32.0 UT) y EB para proteasas, quimotripsina y amilasa (146.5, 144202.8 y 131.0 UT, respectivamente).

Tabla 12. Parámetros de crecimiento de la tilapia, *O. niloticus* alimentada con subproductos agroindustriales durante 60 días

Dietas ¹	IBW	FBW	WG	TL	FER	SGR	FCR	PER	HIS	ISI
<i>Subproductos animales</i>										
FS	0.86±0.1	19.33±4.0	92.3±19.7	11.4±1.1	61.2±0.8	4.8±0.1	1.6±0.0	1.9±0.0 ^a	2.4±0.2	5.4±0.5
WH	0.86±0.2	22.29±3.7	107.2±17.9	10.7±1.4	58.9±4.6	5.0±0.2	1.7±0.1	1.7±0.1 ^{ab}	2.9±0.7	5.5±0.3
BB	1.14±0.1	19.51±3.9	91.9±19.4	10.5±0.8	52.2±3.6	4.3±0.4	1.9±0.1	1.5±0.1 ^c	2.4±0.4	5.1±1.5
RC	0.98±0.3	23.30±1.1	111.6±5.6	11.7±0.3	57.2±6.7	4.8±0.4	1.8±0.2	1.9±0.2 ^a	2.1±0.1	4.6±0.5
RE	0.96±0.2	21.28±2.2	89.7±10.5	10.7±0.2	51.8±3.4	4.6±0.2	1.9±0.1	1.7±0.1 ^{ab}	2.1±0.4	4.4±0.6
<i>P</i>	0.364	0.510	0.354	0.415	0.084	0.184	0.097	0.031	0.192	0.377
<i>Subproductos vegetales</i>										
EB	0.82±0.1	22.41±1.3	100.2±11.3	11.4±0.1	55.2±5.2	4.9±0.4	1.8±0.2	1.9±0.2	2.5±0.1	5.5±0.4
EC	1.05±0.3	23.60±2.8	105.5±25.2	10.8±1.1	56.6±6.9	4.7±0.2	1.8±0.2	2.0±0.2	2.6±0.3	5.0±0.8
CM	0.97±0.2	19.04±0.6	90.4±2.1	10.3±0.6	52.2±4.0	4.5±0.1	1.9±0.2	2.0±0.1	2.1±0.3	5.1±0.7
JM	0.89±0.2	18.77±2.1	89.4±10.4	11.4±0.9	58.1±3.7	4.6±0.2	1.7±0.1	1.9±0.1	2.5±0.7	5.1±0.6
CH	0.99±0.1	22.06±4.0	102.4±25.0	11.5±0.6	53.0±9.1	4.5±0.3	1.9±0.4	2.3±0.4	2.9±0.9	4.8±0.7
RE	0.96±0.2	21.28±2.2	89.7±10.5	10.7±0.2	51.8±3.4	4.6±0.3	1.9±0.1	1.7±0.1	2.1±0.4	4.4±0.6
<i>P</i>	0.733	0.167	0.709	0.249	0.701	0.311	0.733	0.174	0.327	0.495

Promedio ± desviación estándar. Distinta letra por columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 15% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

IBW (g) = Peso inicial; FBW (g) = Peso final; WG (g) = Peso ganado (WG); TL (cm) = Talla; FER (%) = Razón de eficiencia alimenticia; SGR (%) = Taza de crecimiento específico; FCR (%) = Factor de conversión alimenticia; PER (%) = Eficiencia proteínica; HIS (%) = Índice hepatosomático; ISI (%) = Índice intestinal.

Tabla 13. Parámetros hematológicos y bioquímicos de la sangre de tilapia *O. niloticus* alimentada con diferentes ingredientes experimentales durante 60 días

Dietas ¹	Parámetros hematológicos			
	HEM	GLU	TCH	TG
<i>Subproductos animales</i>				
FS	27.5±5.0	138.0±11.3 ^{ab}	260.5±16.3 ^a	389.0±124.5 ^a
WH	27.8±1.9	174.5±9.2 ^a	242.3±24.2 ^{ab}	284.0±31.1 ^{ab}
BB	22.8±4.6	104.0±11.3 ^b	174.0±17.0 ^c	130.0±19.8 ^b
RC	29.3±4.3	110.5±3.5 ^b	200.7±18.8 ^{abc}	179.0±14.1 ^b
RE	31.2±3.8	105.3±11.2 ^b	197.3±16.8 ^{bc}	177.7±7.8 ^b
<i>P</i>	0.215	0.001	0.008	0.015
<i>Subproductos vegetales</i>				
EB	25.5±0.0	116.0±0.0 ^{ab}	192.0±0.0 ^a ^b	146.0±0.0 ^c
EC	28.0±5.8	119.5±0.7 ^{ab}	211.5±10.6 ^{ab}	195.0±24.0 ^{bc}
CM	27.2±8.8	98.7±7.5 ^b	254.0±11.3 ^a	304±1.4 ^a
JM	29.8±3.1	130.3±8.4 ^a	208.3±21.6 ^{ab}	229.5±2.1 ^b
CH	26.8±7.5	123.0±15.6 ^{ab}	182.0±18.2 ^b	157.5±9.2 ^c
RE	31.2±3.8	105.3±11.2 ^{ab}	197.3±16.8 ^{ab}	177.7±7.8 ^c
<i>P</i>	0.923	0.037	0.029	<0.0001

Promedio ± desviación estándar. Distinta letra por columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 15% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

HEM = Hematocrito (%); TP = Proteínas totales ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$); GLU = Glucosa ($\text{m} \cdot \text{dL}^{-1}$); TCH = Colesterol total ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); TG = Triglicéridos ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$).

7.5.3 Composición química corporal

La composición química proximal corporal de los peces se presenta en la Tabla 15. La proteína cruda fue similar ($58.46 \pm 0.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P > 0.05$), pero los lípidos y carbohidratos presentaron significancia ($P < 0.05$) entre las dietas probadas. La concentración media global de lípidos ($20.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) de los grupos experimentales fue mayor que la de RD ($15.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Tabla 14. Actividad enzimática (UT) en tilapia *O. niloticus* alimentada con diferentes ingredientes experimentales durante 60 días

Dietas 1	Actividad de enzimas digestivas				
	Proteasas	Tripsina	Quimotripsina	Amilasa	Lipasa
<i>Subproductos animales</i>					
FS	171.3±29.4 ^a	20806.6±2590.9 ^a	128509.12372.4 ^a	116.5±16.2 ^a	19.0±1.4 ^a
WH	48.4±7.9 ^d	5007.7±1135.7 ^d	49435.3±13014.9 ^d	26.5±6.3 ^d	16.7±0.8 ^{ab}
BB	79.7±23.4 ^c	10777.2±2583.9 ^c	68964.0±3051.8 ^c	52.1±18.3 ^c	15.4±5.7 ^{ab}
RC	129.3±8.5 ^b	14409.6±3472.6 ^b	67000.0±11053.3 ^c	58.5±14.8 ^c	16.3±1.3 ^{ab}
RE	110.7±9.1 ^b	14670.1±2410.4 ^b	96573.2±10236.5 ^b	97.5±13.1 ^b	12.6±2.5 ^b
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.005
<i>Subproductos vegetales</i>					
EB	146.5±9.5 ^a	12999.7±703.5 ^{bc}	144202.8±9204.5 ^a	131.0±9.2 ^a	15.3±2.2 ^{bc}
EC	102.3±15.5 ^c	10724.6±435.5 ^c	123296.7±11040.4 ^b	63.9±3.0 ^c	29.9±3.9 ^a
CM	142.6±14.2 ^a	16381.3±2413.9 ^a	132805.5±13378.0 ^{ab}	127.5±17.3 ^a	32.0±4.3 ^a
JM	79.7±9.5 ^d	7102.1±882.8 ^d	55740.7±4126.3 ^d	54.9±10.0 ^c	14.1±1.2 ^c
CH	125.8±23.1 ^{ab}	13961.3±3312.3 ^{ab}	131950.7±24011.9 ^{ab}	102.2±9.6 ^b	19.4±5.6 ^b
RE	110.7±9.1 ^{bc}	14670.1±2410.4 ^{ab}	96573.2±10236.5 ^c	97.5±13.1 ^b	12.6±2.5 ^c
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Promedio ± desviación estándar. Distinta letra por columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 15% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

7.5.4 Correlaciones

Se encontró una correlación positiva entre la actividad ADC_{ICP} y quimotripsina ($r = 0.57$; $P = 0.003$). La actividad de la quimotripsina aumenta cuando el PER era superior. El HEM presenta correlaciones con FBW ($r = 0.49$; $P = 0.013$), TL ($r = 0.58$; $P = 0.003$), WG ($r = 0.49$; $P = 0.013$), FCR ($r = 0.59$; $P = 0.002$), FER ($r = 0.59$; $P = 0.002$), y PER ($r = 0.51$; $P = 0.009$; Tabla 16).

Tabla 15. Composición química corporal de los peces alimentados con subproductos agroindustriales

Dietas ¹	Proteína cruda	Lípidos	Cenizas	Fibra cruda	NFE
<i>Subproductos animales</i>					
FS	59.0±1.9	18.0±0.2 ^{bc}	16.4±0.9 ^a	0.3±0.0 ^c	6.2
WH	58.6±0.4	19.7±0.4 ^{ab}	13.4±0.4 ^b	1.2±0.1 ^b	7.4
BB	57.3±0.9	21.3±0.7 ^a	13.2±0.3 ^b	2.3±0.1 ^a	5.3
RC	59.1±0.6	20.3±1.3 ^{ab}	14.9±0.1 ^{ab}	1.3±0.1 ^c	4.9
RE	60.0±0.8	15.5±0.0 ^c	16.3±0.4 ^a	1.4±0.1 ^b	6.8
<i>P</i>	0.273	0.002	0.003	<0.0001	0.379
<i>Subproductos vegetales</i>					
EB	57.5±0.1	21.2±1.2 ^a	14.2±0.1 ^b	1.7±0.1 ^b	5.4
EC	57.8±0.8	21.3±1.3 ^a	14.1±0.1 ^{bc}	0.4±0.1 ^c	5.9
CM	58.5±1.0	17.3±0.3 ^b	14.2±0.4 ^b	1.3±0.1 ^b	8.7
JM	58.6±1.0	21.6±0.4 ^a	13.1±0.0 ^{bc}	0.4±0.0 ^c	6.1
CH	58.2±0.4	22.1±0.6 ^a	12.9±0.5 ^c	2.5±0.1 ^a	4.0
RE	60.0±0.8	15.5±0.0 ^b	16.3±0.4 ^a	1.4±0.1 ^b	6.8
<i>P</i>	0.078	0.0007	0.0003	0.0003	0.227

Promedio ± desviación estándar. Distinta letra por columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Notas: ¹ Dietas (en todas las dietas se incluyó el 15% de ingrediente): (RD) Referencia; (FS) ensilado de pescado; (RC) langostilla; (BB) sangre de bovino; (WH) suero lácteo; (EC) garbanzo extruido; (CH) garbanzo; (EB) frijol extruido; (CM) pasta de coco y (JM) *J. curcas*.

Tabla 16. Ecuaciones de regresión que relacionan los parámetros de respuesta y coeficientes de digestibilidad (ADCs), peso final (FBW), longitud total (TL), tasa de crecimiento específica (SGR), peso ganado (WG), tasa de crecimiento específico (FCR), eficiencia alimenticia (FER), eficiencia proteica (PER), hematocrito (HEM) y actividad de quimotripsina (chy)

Y	X	Ecuaciones de regresión	r	P
ADC _{ICP}	chy	y = 0.00038x + 29.636	0.57	0.003
PER	chy	y = 0.0000033x + 1.5901	0.46	0.019

ADC _{CP}	SGR	$y = 8.132x + 49.863$	0.44	0.028
FBW	HEM	$y = 0.30103x + 12.756$	0.49	0.013
TL	HEM	$y = 0.10368x + 8.2194$	0.58	0.003
WG	HEM	$y = 1.6499x + 53.756$	0.49	0.013
FCR	HEM	$y = -0.0227x + 2.4255$	0.59	0.002
FER	HEM	$y = 0.10368x + 8.2194$	0.59	0.002
PER	HEM	$y = 0.02644x + 1.1838$	0.51	0.009

7.6 Expresión de genes de tilapia, *O. niloticus* alimentados con dietas de subproductos agroindustriales incluidos al 15%

7.6.1 Pruebas iniciales de los oligonucleótidos utilizados

Cada juego de oligonucleótido fue probado en reacciones de PCR en punto final utilizando una muestra de cDNA control con el fin de corroborar la obtención de un amplicón único (una sola banda en un gel de electroforesis) y del tamaño esperado. En la Fig. 10 se muestran los productos de PCR para cada una de las reacciones, en donde se muestra una banda única para cada una de las reacciones y de los tamaños esperados.

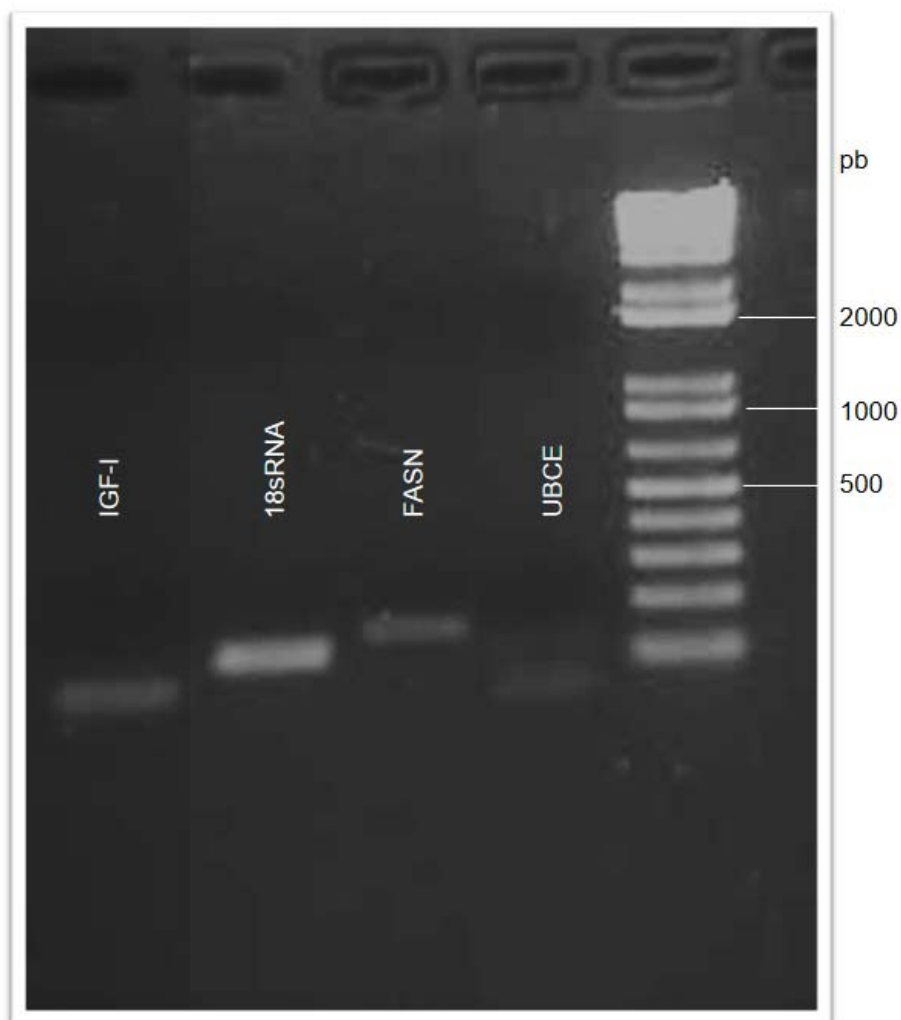


Figura 10. Análisis electroforético de productos de PCR en punto final utilizando los oligonucleótidos para cada una de los genes de interés. Se utilizó como DNA templado el cDNA de una muestra control. El carril de la derecha muestra los marcadores de peso molecular indicándose los tamaños en pares de bases (bp). Los tamaños esperados para cada uno de los genes son: IGF-1, 170 pb; 18sRNA, 111 pb; FASN, 141 pb y UBCE, 130 pb.

7.6.2 Determinación de la eficiencia de la reacción

Para determinar la eficiencia de la reacción, se llevaron a cabo las curvas de calibración con cada uno de los genes a estudiar, utilizando diferentes concentraciones de cDNA (el log de la concentración) contra los Ct obtenidos para cada concentración. Las concentraciones de cDNA utilizadas fueron 100, 10, 1 y 0.1 ng. Para la primera corrida se probó con los oligonucleótidos que amplifican para un segmento del gen FASN. La curva obtenida se presenta en la Fig. 11, de la cual se

obtuvo una R^2 de 0.9958, la pendiente de -3.3278 y un valor de eficiencia de 1.998 y para el gen IGF-1; se obtuvo una R^2 de 0.9975, $M=-3.375$ y una eficiencia de 1.978. En la segunda corrida se probaron los oligonucleótidos del gen normalizador 18sRNA, bajo las mismas condiciones y se obtuvo una R^2 de 0.999, $M=-3.3594$ y una eficiencia de 1.985. La curva de calibración se muestra en la Fig. 12.

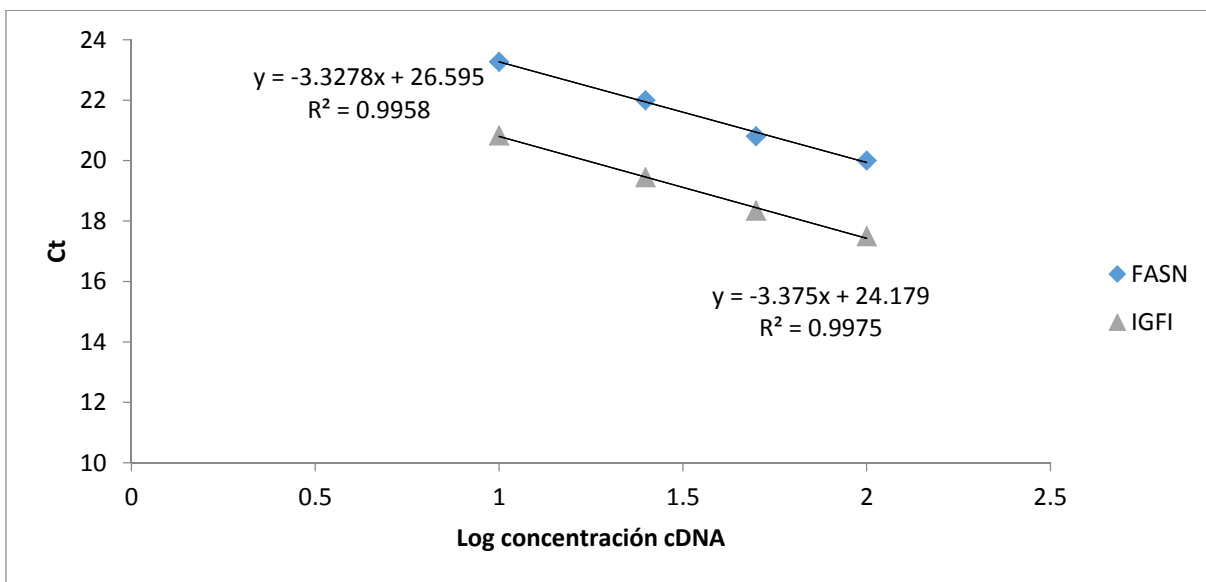


Figura 11. Curva de eficiencia de los oligonucleótidos para los genes FASN e IGF-1.

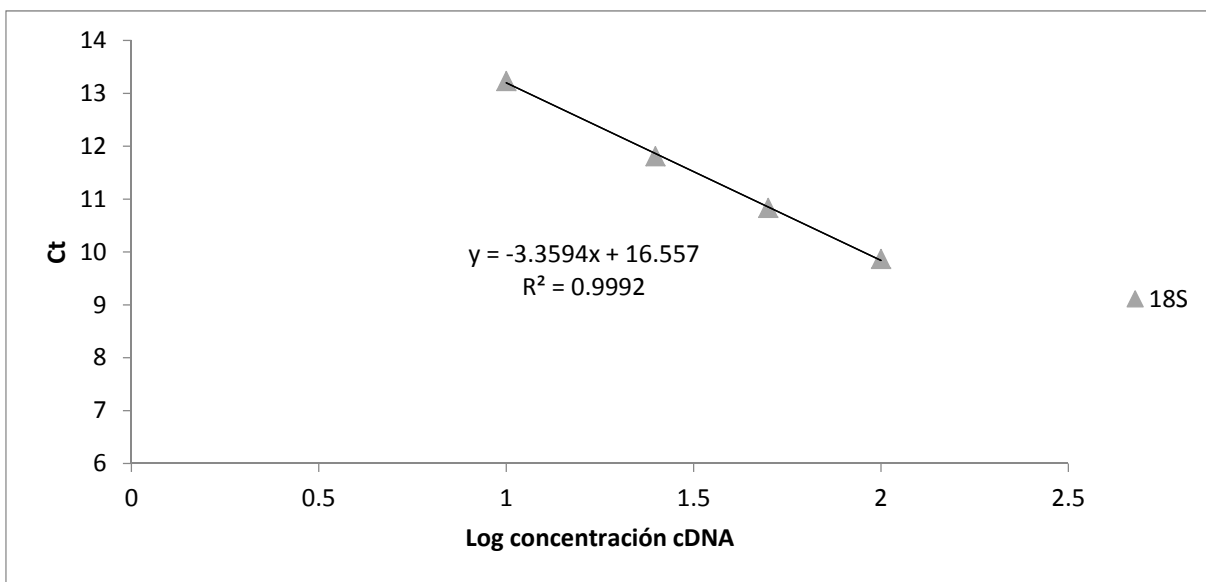


Figura 12. Curva de eficiencia de los oligonucleótidos para el gen normalizador 18sRNA.

7.6.3 Selección del mejor gen normalizador

Se emplearon dos genes normalizadores (18sRNA y UBCE) en todas las expresiones por tratamiento, todos los valores obtenidos se evaluaron mediante el software RetFinder, que evalúa genes de referencia de un amplio grupo de datos. Integra los principales programas computacionales disponibles actualmente (geNorm, NormFinder, BestKeeper, y el método comparativo Ct) para comparar y clasificar los genes candidatos de referencia probados. Sobre la base de la clasificación de cada programa, se asigna un peso adecuado a un gen individual y se calcula la media geométrica de sus pesos para la clasificación general final (Xie *et al.*, 2012).

El gen normalizador más estable fue el 18sRNA, mismo que se usó para el cálculo de la expresión relativa.

7.6.4 Expresión relativa

Los valores de expresión relativa para todos los tratamientos estudiados se muestran en la Tabla 17, en donde se observa que en los únicos casos en los que los resultados fueron significativos ($P < 0.05$) fueron para el gen FASN que mostró una sobre-expresión en el tratamiento RC y una represión en el tratamiento WY, ambos con respecto al tratamiento de referencia (RE). Por otro lado, el gen IGF-1 fue sobre-expresado de manera significativa solamente en el tratamiento EC.

Tabla 17. Expresión relativa de tilapia *O. niloticus* bajo diferentes tratamientos de alimentación. ES, error estándar. En rojo se presentan los casos en los que el valor de P fue significativo

No	Tratamiento		FASN			IGF-1		
			Expresión relativa	ES	P	Expresión relativa	ES	P
1	Referencia	RE	1.0	0.4		1	0.9	
2	Suero lácteo	WY	0.3	0.2	0.05	1.5	0.6	0.57
3	Sangre de bovino	BB	0.7	0.6	0.69	1.9	1.3	0.55
4	Langostilla	RC	19.7	16.3	0.05	2.9	1.6	0.30
5	Garbanzo	CH	2.2	1.1	0.69	0.2	0.1	0.20
6	Garbanzo extruido	EC	3.5	1.7	0.35	1.8	0.7	0.05

8. DISCUSIONES

8.1 Experimento I. Ciclo circadiano de las enzimas digestivas

8.1.1 Actividad enzimática digestiva basal de tilapia *O. niloticus*

El fotoperiodo se considera el factor más importante en los ritmos fisiológicos de los animales. En particular, los ritmos de melatonina proporcionan información al animal acerca de la hora del día, altos niveles de melatonina se sintetizan y liberan principalmente durante la noche (Reiter, 1993). La influencia y el control de estos reguladores sobre la secreción de enzimas digestivas en estado basal en los peces aún no ha sido descrita. La mayoría de los estudios han relacionado la secreción de enzimas digestivas con estímulos alimentarios en experimentos específicos de cada especie. Sin embargo, deben determinarse las respuestas basales en los peces, así como las respuestas a estímulos alimenticios permanentes. La secreción de enzimas activa la ingesta de alimentos (Jun–Sheng *et al.*, 2006), Boujard (1995) demostró que los peces pueden ser entrenados para diversos horarios de alimentación; sin embargo, el consumo voluntario se reduce. El ciclo circadiano de las secreciones de enzimas digestivas en la tilapia en condiciones basales era consistente con López–Olmeda *et al.* (2006). En general, por la mañana, inmediatamente antes de la salida del sol, la secreción de enzimas digestivas baja, manteniéndose en este nivel durante la mayor parte del día hasta la tarde. La actividad de las enzimas digestivas comienza a aumentar al atardecer. Dado que la mayoría de las secreciones enzimáticas basales ocurren en la noche, las estrategias de alimentación pueden ser modificadas para tomar ventaja de los altos niveles de actividad enzimática o someter a los organismos a modificaciones de fases de luz: oscuridad, no obstante el cambio de los fotoperiodos, cambiaría el nivel de melatonina (Randall *et al.*, 1995); ajustando los horarios de alimentación para que se sincronicen con la secreción cíclica de las enzimas digestivas, se podría obtener una mayor ingesta de alimentos, rápida hidrólisis y mayor eficiencia alimenticia. López–Vázquez *et al.* (2000) sugieren que la actividad de la amilasa es más alta aproximadamente dos horas antes de la ingesta de alimentos, tal como los resultados obtenidos en este experimento, la máxima actividad de amilasa es previa a los picos de actividad de tripsina; entonces

de acuerdo a este criterio, puede ser práctico iniciar el proceso de alimentación en el pico de máxima secreción de tripsina. Si los horarios de alimentación se ajustan para coincidir con los picos máximos naturales, la eficiencia alimenticia aumentará, lo que se refleja en el aumento de peso de los peces y ofrece rendimientos más rentables para la acuicultura.

8.1.2 Actividad enzimática circadiana con estimulación alimenticia de tilapia *O. niloticus*

En los vertebrados, después de la ingesta de alimentos, son activados varios mecanismos neurales y hormonales que median la secreción postprandial, para la distensión del estómago, y reducción de los nutrientes que viajan al intestino. Ambos sistemas contribuyen con ajustes precisos de la respuesta secretora para aumentar la eficiencia de la digestión de los alimentos (Kelley, 1992). Montoya *et al.* (2010) demuestran que la alteración de los horarios de alimentación afecta la fisiología y el comportamiento de la dorada, *Sparus aurata*, en los que modifican su capacidad secretora para prepararse para una próxima comida. Por ejemplo, la actividad de la amilasa y proteasa alcalina aumenta algunas horas antes de la alimentación, cuando esta es sistémica, mientras que, en la alimentación sin periodicidad, la actividad de la amilasa aumentó 1 h después de la alimentación y la proteasa alcalina no mostró diferencias estadísticamente significativas. Las proteasas ácidas no mostraron diferencias entre los distintos ritmos de alimentación.

Navarro–Guillén *et al.* (2015), describieron patrones de alimentación y secreción de enzimas digestivas de las larvas post–metamórficas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), demostrando que las larvas tienen mayor ingesta de alimentos durante la noche, que el día, también encontraron que la actividad de la lipasa aumenta antes de la alimentación, sin embargo, la actividad de la tripsina fue constante. En nuestro estudio, las actividades de las enzimas digestivas de la tilapia se estimulan (mayor producción) por la ingesta de alimentos ($P < 0.05$).

En condiciones basales, la actividad enzimática mostró rangos mínimos al mediodía y máximos picos durante la noche, comportamiento similar en condiciones *ad libitum* donde la actividad enzimática se mantiene alta, con una ligera disminución

al mediodía; lo que indica una marcada actividad enzimática nocturna en la tilapia del Nilo. No obstante Sousa *et al.* (2012) alimentaron a la tilapia en tres horarios restringidos; día, noche y mixto; obteniendo una menor eficiencia de la alimentación en la noche, debido a esto se considera prudente ofrecer el alimento a los peces antes de la puesta de sol, para sincronizar el momento de mayor actividad enzimática con el llenado de estómago de los peces.

8.2 Digestibilidad *in vitro*

Se requiere el uso de herramientas eficaces y rápidas para determinar la biodisponibilidad de los nutrientes de nuevas materias primas que puedan emplearse para el cultivo de la tilapia, pudiendo así formular dietas de costos flexibles y eficientemente nutritivas. Algunos métodos de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* se pueden utilizar para medir la bioaccesibilidad de un nutriente dado, a través de la digestión con enzimas para estimar su digestibilidad (Parada y Aguilera, 2007); la digestibilidad *in vitro* de los alimentos ha sido utilizada para predecir la digestibilidad *in vivo*. La mayoría de los últimos estudios sobre la digestibilidad *in vitro* proponen el uso del reactivo de enzima digestiva específica, obtenido a partir de los organismos experimentales adecuados, en las condiciones requeridas (Dimes y Haard, 1994; Lemos *et al.*, 2004; Nolasco, 2008; Hamdan *et al.*, 2009; Márquez *et al.*, 2013). En el presente estudio la digestibilidad se puso a prueba en dos pasos, primero la digestibilidad ácida y después alcalina, a fin de obtener la digestibilidad total; asimismo se emplearon las enzimas de tilapia tal como lo recomiendan, para llevar a cabo el ensayo *in vitro* de manera similar como ocurre en la tilapia, según lo propuesto por Clements y Raubenheimer (2005) y Hamdan *et al.* (2009). La hidrólisis ácida de las proteínas en la tilapia es un paso fundamental ya que aumenta la eficiencia de la hidrólisis intestinal, dando lugar a un cambio significativo de polipéptidos solubles de oligo- y dipéptidos y aminoácidos libres, según lo informado por Grabner y Hofer (1985); también, incrementa potencialmente la disponibilidad de la proteína para la digestión alcalina, por el medio ácido y la inactivación y destrucción de inhibidores de proteasas tal como lo propusieron Hamdan *et al.* (2009) y Pedersen y Eggum (1983). Yasumaru y Lemos (2014) midieron el DH

(grado de hidrólisis) de ingredientes (subproductos de origen vegetal y animal), utilizando las enzimas digestivas de la tilapia del Nilo; encontraron una correlación significativa (la pre-hidrólisis ácida aumenta la hidrólisis de ciegos pilóricos/intestino) con la digestibilidad *in vivo*; considerado un atributo ya que, es sabido que los ensayos *in vivo*, pueden ser complejos, laboriosos, consumen más tiempo, y posiblemente no son adecuados para el control de calidad a nivel industrial (Lee y Lawrence, 1997; Givens y Deaville, 1998; Lazo y Davis, 2000; Castillo *et al.*, 2002).

En este estudio, todos los ingredientes se sometieron primero a digestión por las enzimas del estómago de la tilapia, a pH ácido que, en términos generales, fue mucho menor que la hidrólisis alcanzada en la digestión alcalina; la cual fue favorecida por el proceso ácido. Yasumaru y Lemos (2014), observaron un aumento en el DH para la mayoría de los ingredientes que primero fueron hidrolizados con enzimas ácidas del estómago y posteriormente con alcalinas de ciegos pilóricos/intestino (dos fases de digestión); a los valores de DH de la digestión únicamente alcalina o solamente ácida.

Aunque varios autores han supuesto que el método de hidrolisis por medio de pH-stat sobre estima los valores de DH de los ingredientes (por ejemplo, Salmónidos, Haard, 1993; *Sparus aurata*, Alarcón *et al.*, 2002; Crustáceos, *Penaeidae*, Fernández *et al.*, 2009 y *Gadus morhua*, Tibbetts *et al.*, 2011), no es confrontable con este estudio, ya que en algunos de esos experimentos solo se realiza una fase de digestión y no se simula de manera tan similar el sistema *in vivo*, tal como se llevó a cabo.

Los ingredientes de origen animal, mostraron mayor hidrolisis alcalina que ácida, excepto RC, de acuerdo con estudios sobre la composición de RC, se sabe que la mayor proporción del exoesqueleto se compone de quitina (Spinelli, 1974), Danulat y Kausch (1984) demostraron que la actividad quitinasa en el apéndice pilórico es menor que la del estómago, además de que dicha actividad se ve disminuida con valores de pH superiores a 6.5, lo cual pudo afectar la hidrolisis de RC en el intestino, obteniendo la digestibilidad más baja de los ingredientes de origen animal. Aunque los ingredientes de origen animal tuvieron mayor digestibilidad que los ingredientes vegetales, se observó que cuando los subproductos vegetales han

recibido pre-tratamientos, como pelado, remojo y extrusión (frijoles y garbanzos), presentan valores más altos de digestibilidad respecto a los demás ingredientes ensayados. Por lo tanto, se recomienda aplicar en medida de lo posible, pre-tratamientos a los ingredientes vegetales, que reduzcan el contenido de factores anti-nutricionales y aumenten la exposición de las proteínas lo cual permite se lleve a cabo una mayor digestión. No obstante, las dietas con inclusión de ingredientes vegetales, fueron digeridas de igual manera que RD. Se recomienda determinar la digestibilidad *in vitro* (en dos etapas: ácido y alcalino), utilizando las enzimas digestivas de tilapia, como pre-selección de ingredientes y para dietas de prueba que contengan subproductos de origen animal y vegetal, acrecentando su potencial uso en la acuicultura de tilapia.

8.3 Experimento II. Crecimiento en horarios circadianos

Durante las primeras semanas de crecimiento se presentaba ventaja en los tratamientos donde se ofrecía alimento en horarios nocturnos y el control, sin embargo, para la quinta biometría, los diferentes horarios de alimentación no tuvieron impacto en el crecimiento de los animales, aunque se considera factor importante la actividad enzimática digestiva para un óptimo aprovechamiento de los alimentos, ya se había probado la alimentación nocturna absoluta en tilapia (Sousa *et al.*, 2012) con bajo rendimiento en crecimiento comparado con horarios diurnos, no obstante, se planeó, coincidir con la máxima actividad digestiva para la tilapia. Aún pueden probarse horarios más extensos de alimentación, donde se abarque mayor rango de actividad enzimática elevada. Basado en estos resultados, se puede decir que la tilapia, además de presentar una amplia capacidad de adaptación a variados sistemas y condiciones de cultivo como se ha descrito, también, puede entrenarse para distintos horarios de alimentación y hacer uso adecuado de los nutrientes, a pesar de presentar capacidad digestiva nata regulada de manera circadiana. Lo que hace del cultivo de tilapia aún más adaptable y fácil de realizar.

8.4 Experimento III. Digestibilidad *in vivo*

Cuando se utilizaron subproductos animales, los mejores coeficientes de digestibilidad se obtuvieron para el ensilado de pescado y el suero lácteo, esto puede deberse a que contiene proteínas de alta calidad. En el proceso de ensilado del pescado, sucede la licuefacción debida a la proteólisis autolítica, sin crecimiento bacteriano, ya que el pH es mantenido siempre bajo, entonces las proteínas se rompen en unidades más pequeñas, es decir, péptidos y aminoácidos libres (Arason, 1994). De tal manera que, en dicho proceso, lejos de una reducción de nutrientes en los alimentos, estos son óptimos para ser incluidos en piensos para animales como ingrediente de bajo costo (Perez, 1995). Estudios sobre alimentación, digestibilidad y crecimiento en especies de aguas cálidas, incluyendo la carpa *Cirrhinus mrigala* (Ali *et al.*, 1994), tilapia *O. niloticus* (Fagenbro y Jauncey, 1993), *O. aureus* (Goddard y Al-Yahyai, 2001; Goddard *et al.*, 2003), y pacu *Piaractus mesopotamicus* (Vidotti *et al.*, 2002), han comprobado que el ensilado de pescado puede ser altamente digerible y eficaz para la sustitución de la harina de pescado hasta el 75%. Es así, que los ADCs obtenidos para el ensilado de pescado fueron similar a los reportados para la tilapia por Hanley (1987; 86%) y Watanabe *et al.* (1996; 92%). La harina de suero lácteo, contiene una mezcla rica y heterogénea de proteínas a lo que puede atribuirse su alta digestibilidad, sin estudios preliminares en los peces, ha sido probado en animales de granja donde ha sido empleada de manera eficiente; Toullec *et al.*, 1974 obtuvieron un valor de 91% de digestibilidad en el intestino prerumiante de terneros.

La quitina es un carbohidrato complejo que forma la parte estructural del exoesqueleto de los crustáceos y constituye del 15–30% de su peso total (Garzón *et al.*, 1993). La quitina de crustáceos se ha encontrado en la forma alfa, que es la forma más estable debido a los enlaces de hidrógeno entre ellas. La rigidez del exoesqueleto de crustáceos es debido a la inclusión de sales de calcio en los espacios existentes entre las fibras de quitina, a la que, en ocasiones, algunas proteínas se adhieren (Roer y Dillaman, 1984; Stevenson 1985; Goffinet y Compere, 1986). La harina de RC tiene altas concentraciones de quitina, cenizas (minerales) y proteínas, sin embargo, presenta bajos valores de digestibilidad, atribuida a la no

biodisponibilidad que presentan. Por ejemplo, Meyers y Rutledge (1971) señalan que el alto contenido de quitina en los alimentos de crustáceos puede causar deficiencias de manganeso suministradas a los animales. En esta investigación se obtuvieron los valores más bajos de ADC. Shiau y Yu (1999) obtuvieron bajo ADC en materia seca utilizando dietas con alto contenido de quitina en tilapia. Por el contrario, Casillas y Magallón (1988), Millán (1992), Villarreal y Castro (1992), Civera *et al.* (1992), Villarreal *et al.* (1994) y Civera *et al.* (1994) reportaron buenos resultados de crecimiento del camarón cuando se incluye harina de cangrejo rojo en su dieta.

Halver y Hardy (2002) señalaron que una deficiencia de aminoácidos esenciales en la dieta de los organismos acuáticos afecta negativamente la utilización de las proteínas, causa reducción de crecimiento de los peces, por lo tanto, baja eficiencia de los alimentos. El-Sayed (1998) reportó un bajo rendimiento en el crecimiento de la tilapia del Nilo (150 días de cultivo) al sustituir totalmente la harina de pescado con harina de sangre en la dieta. En nuestro estudio, la deficiencia de isoleucina y metionina en la harina de sangre de bovino (NRC, 1983; Tacon y Jackson, 1985) es la causa más probable de obtener el valor más bajo de ADC_{CP} , a pesar de ser este el ingrediente que contiene la mayor concentración de proteína (84%). La digestibilidad y absorción de los nutrientes de la harina de sangre se puede incrementar añadiendo el aminoácido esencial necesario (Davies *et al.*, 1989).

Aunque las tilapias son peces omnívoros que poseen adaptaciones morfológicas y fisiológicas para la utilización de dietas altas en fibra, las fuentes vegetales contienen diversas sustancias naturales, llamadas factores anti-nutricionales, que cuando se ingieren interfieren con el uso de los nutrientes. Estas sustancias pueden actuar inhibiendo las enzimas digestivas, dañar la mucosa intestinal o la modificación de los nutrientes que impiden su absorción. Sin embargo, estas sustancias son termolábiles y en ingredientes tratados térmicamente, se reducen o eliminan, lo que causa que los ADCs se incrementen (Frías *et al.*, 2000). También, el contenido de otros antinutrientes en los vegetales, como compuestos fenólicos enlazados con proteínas, por enlaces no covalentes, reducen su disponibilidad nutricional (Hahn *et al.*, 1984). Asimismo los inhibidores de tripsina,

que interfieren con la digestión de las proteínas lo que reduce la digestión de los nutrientes en el pescado (Birk, 1989). De tal manera, que el proceso térmico durante la extrusión del frijol y garbanzo pudo haber reducido factores antinutricionales y disminuir los inhibidores de tripsina, logrando subproductos más digestibles en este estudio. El contenido de ácido fítico en el garbanzo es $5.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Nestares *et al.*, 1999), se ha observado que el ácido fítico reduce la biodisponibilidad de Ca^{+2} y Zn^{+2} (Cheryan, 1980; Selle *et al.*, 2000). Aunque el ácido fítico o fitato de sodio, es el fitato natural que se encuentra en algunas plantas, no son digeridos por los peces (Vielma *et al.*, 2000). En cuanto a los ingredientes no extrusionados, por ejemplo, harina de garbanzo, *J. curcas* y la pasta de coco, dieron los menores valores de digestibilidad por la tilapia. De la misma manera, los bajos valores de ADCs en *J. curcas*, se atribuye a la presencia de factores antinutricionales que contiene (fitatos, lectinas, inhibidores de la tripsina y ésteres de forbol). La presencia de ácido fítico en los piensos, forma complejos químicos que alteran la estructura de la proteína, disminuyendo su solubilidad, la digestibilidad y la actividad enzimática (Spinelli *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1985; Hossain y Jauncey, 1993; y Vielma *et al.*, 2000). Además, el ácido fítico produce anomalías en el epitelio intestinal, que reducen la absorción de nutrientes y la disponibilidad de energía disminuyendo el rendimiento del crecimiento de peces. Makkar y Becker (2009) y Kumar *et al.* (2011), obtuvieron bajos valores de ADC para *J. curcas* en tilapia *O. niloticus*. Los valores de ADC bajos obtenidos para la harina de coco pueden explicarse por su alto contenido de fibra. Jackson *et al.* (1982) concluyeron que la inclusión de harina de coco en las dietas formuladas con 30% de PC para *O. mossambicus* durante 7–9 semanas, puede sustituir la harina de pescado de manera eficiente sin afectar el crecimiento de los peces. Sin embargo, Thorne *et al.* (1990) concluyeron que la harina de coco es deficiente en lisina, un aminoácido esencial que se puede añadir.

8.5 Experimento IV. Crecimiento con subproductos agroindustriales

En la tilapia, la combinación de la longitud intestinal, junto con la amplia distribución de enzimas (proteasas, amilasas, lipasas, etc.) a lo largo del tubo digestivo, aumenta la posibilidad de digerir diferentes fuentes dietéticas para descomponer los nutrientes

en pequeñas partículas que fluyen en el torrente sanguíneo para la construcción de tejidos y mejorar las respuestas de crecimiento global.

En este estudio, la dieta FS mostró los valores más altos de actividad enzimática y ADC, que coinciden con las más altas concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos en la sangre, lo que sugiere un fuerte transporte de estos elementos en el torrente sanguíneo. Esto puede explicarse en parte por el proceso químico (hidrólisis) de la harina de FS que produce pequeñas partículas fácilmente asimilables por tilapia, tales como péptidos y aminoácidos (Arason, 1994). Asimismo, FS presentó la mayor actividad enzimática digestiva de los tratamientos con subproductos animales.

En este estudio, a pesar de contener la mayor concentración de proteína, BB presentó los ADCs más bajos de materia seca y de ingredientes, también, valores inferiores de PER respecto a las dietas que contenían subproductos de origen animal. La baja eficiencia proteica puede deberse a la deficiencia de aminoácidos específicos en este ingrediente, lo que ocasiona desequilibrio nutricional y no permite el aprovechamiento de la proteína total.

Aunque RC ha sido probado con éxito en las dietas para crustáceos (Casillas y Magallón 1988; Villarreal *et al.*, 2006) se aprecia mal digerida por la tilapia. El alto contenido de ceniza que se encuentra en la harina de RC se atribuye principalmente al alto contenido mineral en la quitina (Jung *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de los bajos coeficientes de digestibilidad observados para la dieta RC, la tasa de eficiencia proteica que la tilapia obtiene cuando se utilizó esta dieta es alta y similar a los obtenidos con el FS y WH. Esto puede deberse a la presencia de promotores de crecimiento similar a la insulina en la harina de RC (Vega-Villasante *et al.*, 2002). Vale la pena señalar, sin embargo, que en la actualidad no existe una pesquería comercial de RC, lo que constituye una limitación para su uso en las dietas acuícolas, solo se considera subproductos de cosechas de acompañamiento.

A pesar de los componentes antinutricionales que contienen las fuentes vegetales por su origen, al formar parte de la formulación de dietas balanceadas para tilapia, no presentaron desventaja en el crecimiento respecto a la dieta de referencia ni a los tratamientos experimentales de origen animal. Lo cual puede deberse

principalmente a que el porcentaje de inclusión no impacta realmente el crecimiento de los organismos y además la tilapia realiza ajustes fisiológicos para poder aprovechar un sinnúmero de nutrientes de diversas fuentes. Aun así, la presencia de ácido fítico en los alimentos, forma complejos químicos que alteran la estructura de la proteína, disminuyendo su solubilidad, digestibilidad y actividad enzimática (Spinelli *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1985; Hossain y Jauncey 1993 y Vielma *et al.*, 2000), a lo que puede atribuirse los bajos valores de ADC y alteraciones en la actividad enzimática de algunos ingredientes; ya que la tilapia necesita mayor actividad digestiva en ingredientes con nutrientes menos disponibles, tal como se observa en el garbanzo crudo, donde se ve aumentada la actividad de las enzimas digestivas respecto a garbanzo extruido. La dieta JM con alto contenido de antinutrientes al no haber sido sometida a tratamientos térmicos, mostró baja actividad de la tripsina, baja ADC y bajo contenido de TG en la sangre, debido a los inhibidores de tripsina que interfieren con la digestión de las proteínas lo que reduce la digestión de los nutrientes en el pescado (Birk, 1989).

A pesar de las diferencias encontradas en la composición bioquímica de las dietas, parámetros de crecimiento de tilapia, la utilización de nutrientes, los índices biológicos, los parámetros sanguíneos, la actividad enzimática digestiva; se obtuvo el mismo rendimiento en el cultivo y la misma composición corporal en los peces, entre los tratamientos animales, vegetales y de referencia; lo que deja ver, que a pesar de todas estas variaciones causadas por la fuente de nutrientes, la tilapia pudo hacer uso eficiente de las dietas ofrecidas.

8.6 Expresión de genes

La utilización de los carbohidratos ha sido estudiada en muchos peces cultivados (Hemre *et al.*, 2002). Generalmente se acepta que los peces no tienen un requerimiento específico de glucosa en la dieta (NRC, 2011), sin embargo, se ha observado en algunos peces, hiperglucemia postprandial con dietas altas en carbohidratos, que se asocia a un crecimiento retardado y en algunas ocasiones ligado a "hígado graso" (Hemre *et al.*, 2002; Enes *et al.*, 2009). Las dietas altas en carbohidratos inducen la secreción de insulina, que estimula la absorción de glucosa

hepática, mejorando así la actividad enzimática glicolítica hepática y que conduce a un aumento en el contenido de glucógeno hepático para mantener la homeostasis de la glucosa. La glucosa, como uno de los precursores de acetil-CoA, es el sustrato principal para la síntesis de ácidos grasos en el hígado. La sintasa de ácidos grasos (FASN) juega un papel de iniciador en el proceso de lipogénesis de *nov*o catalizando acetil coenzima A y malonil coenzima A en el producto final, el palmitato, el cual posteriormente se esterifica y se almacena en el tejido adiposo (Smith *et al.*, 2003), para consumo de energía en los animales o bien para almacenamiento energético. En nuestro estudio el gen FASN fue sobre expresado en RC y reprimido para WH, de manera viceversa, WH fue el ingrediente más digerido y RC el de menor digestibilidad. La diferencia principal en RC y WH radica en la biodisponibilidad de la proteína que contienen además de que WH supera a RC en concentración proteica. Probablemente RC recurrió a la síntesis de lípidos para la obtención de energía y WH a las proteínas como fuente energética, reprimiendo de esta manera la expresión de FASN, tal como se observó en *Sparus aurata*, donde los peces alimentados con bajo contenido de proteína mostraron mayor expresión de glucoquinasa hepática - precursor de la expresión de FASN- (Caseras *et al.*, 2002; Meton *et al.*, 2004; Xiong *et al.* 2014). De manera general se observó baja expresión de FASN en las dietas que contienen altas concentraciones de proteína (bajas de carbohidratos) tal como Azaza *et al.* (2013) que encontraron acumulación de canales de lípidos en la tilapia alimentados con una dieta alta en carbohidratos, que atribuyeron a la síntesis de *nov*o de lípidos (expresión de FASN) ya que el aumento de la expresión de FASN puede marcadamente inducir el depósito de triglicéridos en el cuerpo (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

El IGF-1 se considera generalmente como un indicador que refleja el crecimiento de los peces. En tilapia (*O. niloticus*), se ha reportado una correlación positiva entre la expresión de IGF-1 en el hígado y la tasa de crecimiento (Vera Cruz y Brown, 2009). La concentración de IGF-1 en el suero también presentó una correlación lineal con el crecimiento de tilapia *O. mossambicus* (Uchida *et al.*, 2003) y juveniles de salmón coho (Beckman *et al.*, 2004). No obstante, la tilapia bajo las condiciones de cultivo ensayadas, no presentaron diferencias en el crecimiento, y

sólo uno de los tratamientos (EC) sobre-expresó el gen IGF-1. A pesar que el IGF-1 ha sido ligado de manera directa como regulador del crecimiento, Mentón *et al.* (1999), no encontraron ninguna correlación entre el crecimiento corporal y la expresión hepática de IGF-1 mRNA. A este respecto, el papel que juega el IGF-1 expresado de hígado en el crecimiento corporal de peces merece ser estudiado con mayor detalle pues sigue sin ser definido.

9. CONCLUSIONES

Experimento I

1. La actividad enzimática digestiva en la tilapia del Nilo, *O. niloticus*, es regulada por periodos de luz y oscuridad (ritmos circadianos).
2. La tilapia presenta actividad enzimática digestiva mayor durante la noche que durante el día.
3. Los ritmos naturales de secreción enzimática pueden ser estimulados por los alimentos.

Experimento II

1. La tilapia puede entrenarse para horarios de alimentación indistintos y hacer uso eficiente del alimento.

Experimento III

1. La tilapia *O. niloticus* es capaz de digerir de la misma manera las dietas con los subproductos animales y vegetales ensayados.
2. Los ingredientes pre-tratados (WH, FS, EB y EC), fueron más digestibles para la tilapia.

Experimento IV

1. La respuesta de la tilapia parece responder a la energía global de las dietas.
2. La tilapia es capaz de usar principalmente energía no proteica, reservando a las proteínas para su posterior uso para crecimiento.
3. La tilapia *O. niloticus* fue capaz de utilizar diferentes subproductos animales y vegetales mediante el ajuste de su fisiología digestiva.
4. La cuantificación del hematocrito puede usarse para proyectar el rendimiento del cultivo.
5. La represión del gen FASN en la dieta WH (alta en proteína) se debe a que la tilapia no recurre a rutas energéticas de lípidos, debido a la energía obtenida de las proteínas.

9.1 Conclusiones generales

1. El suero lácteo, ensilado de desechos de tilapia, frijol y garbanzo extruido obtuvieron elevados valores de digestibilidad, actividad enzimática y transporte de nutrientes, lo que brinda certeza de que, al ser añadido en formulaciones para el cultivo de tilapia, se obtendrán altos rendimientos de producción.
2. Es importante formular en base a proteína digestible, con el objetivo de que el organismo no utilice la proteína como fuente de energía.
3. La tilapia puede entrenarse para iniciar los periodos de alimentación a cualquier horario.
4. El hematocrito es un parámetro sanguíneo que permite predecir el rendimiento del cultivo y estado fisiológico de los animales cultivados. Se correlaciona con el crecimiento, talla, factor de conversión alimenticia y eficiencia proteica.

10. LITERATURA CITADA

- Abdel-Tawwab M. 2012. Effects of dietary protein levels and rearing density on growth performance and stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). International Aquaculture Research. DOI: 10.1186/2008-6970-4-3.
- Akeson W.R., Stahmann M.A. 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. Journal of Nutrition 83: 257-261.
- Akiyama D.M., Coelho S.R., Lawrence A.L., Robinson E.H. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Panaeus vannamei* BOONE. Nippon Suisan Gakkaishi 55(1): 91-98.
- Alarcón F.J., Moyano F.J., Díaz M. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. Journal of the Science of Food and Agriculture 82(7): 697-704.
- Ali M.Z., Gheyasuddin S., Zaher S., Hossain M.A., Islam, M. N. 1994. Evaluation of fish silage from underutilised marine fishes as protein sources in the diet of major carp (*Cirrhinus mrigala*). Journal of Aquaculture in The Tropics 8: 247-254.
- Allen R.D. 1984. Feedstuffs ingredient analysis table. Feedstuffs 56 (30): 25-30.
- Álvarez-Díaz A., Pérez E.H., Martín H.T.C., Quincosa T.J., Sánchez P.A. 2009. Fisiología animal aplicada. 1ra edición. Editorial Universidad de Antioquia. Pp. 321.
- Amano M., Iigo M., Ikuta K., Kitamura S., Okuzawa K., Yamada H., Yamamori K. 2004. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. Zoological Science of Japan 21(1): 79-85. DOI: 10.2108/zsj.21.79
- Amano M., Iigo M., Ikuta K., Kitamura S., Yamada H., Yamamori K. 2000. Roles of melatonin in gonadal maturation of underyearling precocious male masu salmon. General and Comparative Endocrinology 120(2): 190-197. DOI: 10.1006/gcen.2000.7547
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. Journal of General Physiology 22(1): 79-89. DOI: 10.1085/jgp.22.1.79
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, 18th edn. AOAC International, Rockville, MD, USA.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis, 14th edn. (Arlington, VA).
- Arason S. 1994. Production of fish silage. In: Fisheries Processing: Biotechnological applications. Ed. A.M. Martin. Pp. 244-272. Chapman and Hall, London.

- Azaza M.S., Khiari N., Dhraief M.N., Aloui N., Kraïem M.M., Elfeki A. 2013. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. *Aquaculture Research*. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12153>.
- Ballesteros N.N.E., Segura L.M. Epa M., Sánchez J.I Pérez G.E. 2014. Potencial nutricional del uso de la sangre animal recuperable en el mundo. Capítulo dos. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, México.
- Barbosa-Ribeiro F., Teixeira-Lanna E.A., Delmondes-Bomfim M.A., Lopes-Donsele J., Quadros M., Lima-Cunha P.S. 2011. Treu and apparent digestibility of protein and amino acids of feed in Nile tilapia. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(5): 939–946.
- Bayarri M.J., García-Allegue R., López-Olmeda J.F., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J. 2004. Circadian melatonin release *in vitro* by European sea bass pineal. *Fish Physiology and Biochemistry* 30(1): 87–89. DOI: 10.1007/s10695-004-6002-8
- Beckman B.R., Shimizu M., Gadberry B.A., Cooper K.A. 2004. Response of the somatotrophic axis of juvenile coho salmon to alterations in plane of nutrition with an analysis of the relationships among growth rate and circulating IGF-I and 41k Da IGFBP. *General and Comparative Endocrinology* 135: 334–344.
- Bio-Rad Laboratories. 2006. Real-time PCR applications guide. Inc. All rights reserved. Bulletin 5279.
- Birk Y. 1989. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. In J Huisman, AFB Van der Poel, IE Liener (Eds.), *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds* (pp. 83–94). The Netherlands: Pudoc: Wageningen.
- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911–917.
- Boujard T. 1995. Diel rhythms of feeding activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiology and Behavior* 58(4): 641–645. DOI: 10.1016/0031-9384(95)00109-V
- Bracho M., Marquez E., Arias B. 2001. Estudio comparativo del contenido de aminoácidos esenciales en sangre de bovino y cerdo. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad del Zulia* 9(2): 133–138.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Bromage N.R., Porter M.J.R., Randall C.F. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197(1–4): 63–98. DOI: 10.1016/S0044–8486(01)00583–X
- Bruno–Santos V., Reginato–Martins T., Fonseca–Freitas R.T. 2012. Body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in different length class. *Ciência Animal Brasileira Goiânia* 13(4): 396–405.
- Bruton M.N., Bolt R.E. 1975. Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *Journal of Fish Biology* 7:423–445.
- Cahill G.M. 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell and Tissue Research* 309(1): 27–34. DOI: 10.1007/s00441–002–0570–7
- Canioni P., Julien R., Rathelot J., Sarda L. 1977. Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids* 12: 393–397.
- Caseras A., Metón I., Vives C., Egea M., Fernández F., Baanante I. 2002. Nutritional regulation of glucose–6–phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* 88: 607–614.
- Casillas H.R., Magallón B.F. 1988. Substitución de insumos tradicionales en las dietas para la engorda del camarón. Informe Interno. Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., México.
- Casillas–Hernández R., Nolasco–Soria H., Lares–Villa F., García–Galano T., Carrillo–Farnes O., Vega–Villasante F. 2006. Ritmo circadiano de la actividad enzimática digestiva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su efecto en el horario de alimentación. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 2(2): 55–64.
- Castelló Orvay F. 1993. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Puublicaciones de la Universitat de Barcelona. Pp.190.
- Castillo G., Sanz M.A., Serrano M.A., Hernández A. 2002. Influence of protein source, type, and concentration, and product form on the protein quality of commercial enteral formulas. *Journal of Food Science* 67(1): 328–334.
- Castro-González M.I., Carillo-Domínguez S., Pérez-Gil Romo F., Calvo-Carrillo C. 1995. Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos, en *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.C., pp 163–177

- Cassone V.M. 1990. Melatonin: time in a bottle. Pp. 319–367. *In*: Milligan S.R. (ed.) Oxford Reviews of Reproductive Biology Vol. 12. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Cassone V.M. 1998. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiology International* 15(5): 457–473. DOI: 10.3109/07420529808998702
- Chavan J.K., Kadam S.S., Salunkhe D.K. 1987. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 25(2): 107–156.
- Chavan J.K., Kadam S.S., Salunkhe D.K. 1989. Chickpea. En “CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization”. Vol 1, pp. 247–288. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, EUA.
- Cheryan M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13: 297–335.
- Cho C.Y., Slinger S.J. 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. *In*: JE Halver and K Tiews (eds.). *Finfish nutrition and fishfeed technology* vol. 2. Heenemann, Berlin, pp. 239–247.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66(6): 1219–1227.
- Cira L.A., Guerrero I., Huerta S., Hall G.M., Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem* 37: 1359–1366.
- Clements K.D., Raubenheimer D. 2005. Feeding and nutrition. *In*: Evans, D.H. and J.B. Claiborne (Eds.) *The Physiology of Fishes*, 3rd ed. CRC Press, New York, pp. 47–82.
- Cockson A., Bourne D. 1972. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 41(1): 715–718. DOI: 10.1016/0300–9629(72)90335–0
- CONAPESCA. 2014. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Plan Rector de Acuacultura y Pesca 2014. 65pp
- Córdoba–Murueña J.H., García Carreño F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210(1–4): 371–384.
- Cruz–Suárez L.E., Tapia–Salazar M., Villarreal–Cavazos D., Beltran–Rocha J., Nieto–López M.G., Lemme A., Ricque–Marie D. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 292 :87–94.

- Danilova N., Krupnik V.E., Sugden D., Zhdanova I.V. 2004. Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *FASEB Journal* 18(6): 751–753. DOI: 10.1096/fj.03–0544fje
- Danulat E., Kausch H. 1984. Chitinase activity in the digestive tract of the cod, *Gadus morhua* (L.). *Journal of Fish Biology* 24(2): 125–133.
- Davies S.J., Williamson J., Robinson M., Bateson R.I. 1989. Practical inclusion levels of common animal by-products in complete diets for tilapia *Oreochromis mossambicus*, Peters. In: Proc. 3rd Intl. Symp. On Feeding and Nutr. Fish. Toba, Japan, pp. 325–332.
- De la Vega J. 2008. *Jatropha curcas*, Agro-energía y agro-proyectos, México.
- De Silva S.S., Perera M.K. 1984. Digestibility in *Sarotherondon niloticus* fry: Effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility. *Aquaculture* 38: 293–306.
- DelMar E.G., Largman C., Brodrick J.W., Geokas M.C. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochemistry* 99: 316–320.
- Del Mar E.G., Brodrick J.W., Geokas M.C., Largman C. 1979. Effect of oxidation of methionine in a peptide substrate for human elastases: A model for inactivation of α_1 -protease inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88(2): 346–350. DOI: 10.1016/0006–291X(79)92054–0
- Desrosiers T., Bergeron G., Savoie L. 1987. Effect of heat treatments on *in vitro* digestibility of delactosed whey proteins as determined by the digestion cell technique. *Journal of Food Science* 52(6): 1525–1528.
- Dimes L.E., Haard N. 1994. Estimation of protein digestibility — I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 108(2–3): 349–362.
- Domínguez P.L. 1997. Desperdicios procesados y subproductos agroindustriales y de pesca en la alimentación porcina en cuba. Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, Cuba. FAO.
- Draper N.R., Smith H. 1981. Applied regression analysis. 2nd edn. John Wiley and Sons, New York, NY, USA.
- Duarte R., Carvalho M. 1999. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 321–236.
- Eknath A.E., Hulata G. 2009. Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Reviews in Aquaculture* 1(3–4): 197–213. DOI: 10.1111/j.1753–5131.2009.01017.x

- Ekstrm P., Meissl H. 1997. The pineal organ of teleost fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7(2): 199–284. DOI: 10.1023/A:1018483627058
- El-Mowafi A.F., Dorrell H., Bureau D.P. 2000. Potential of a pH-stat method to estimate apparent digestibility of protein in salmonids. IX International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish, 21–25 May 2000, Miyazaki, Japan.
- El-Sayed A.F.M. 1998. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Feeds Aquaculture Research* 29: 275–280.
- El-Sayed A.F.M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* 179(1–4): 149–168. DOI: 10.1016/S0044–8486(99)00159–3
- El Sayed A.F.M., Teshima S.I. 1991. Tilapia nutrition in aquaculture. *Reviews in Aquatic Sciences* 5(3–4): 247–265.
- Ellefson R.D., Caraway W.T. 1976. Fundamentals of clinical chemistry. In: Tietz, NW editor. Saunders W. B. Philadelphia, USA.
- Enes P., Panserat S., Kaushik S., Oliva-Teles A. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 519–539.
- Erlanger B.F., Kokawsky N., Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95(2): 271–278. DOI: 10.1016/0003–9861(61)90145–X
- Espe M., Haaland H., Njaa L.R. 1992. Substitution of fish silage protein and a free amino acid mixture for fish meal protein in a chicken diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58: 315–319.
- Espe M., Raa J., Njaa L.R. 1989. Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 49: 259–270.
- Ezquerro J.M., García-Carreño F.L., Carrillo O. 1998. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 163(1–2): 123–136.
- Fagbenro O.A. 1994. Dried fermented fish silage in diets for *Oreochromis niloticus*. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh* 46: 140–147
- Fagbenro O., Jauncey K. 1993. Chemical and nutritional quality of raw, cooked and salted fish silages. *Food Chemistry* 48: 331–335.
- Falcón J., Besseau L., Fazzari D., Attia J., Gaildrat P., Beauchaud M., Boeuf G. 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* 144(10): 4648–4658. DOI: 10.1210/en.2003–0707

- Falcón J., Thibault C., Begay V., Zachmann A., Collin J.P. 1992. Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. Pp. 167–198. *In*: Ali, M.A. (ed.) Rhythms in fishes. Plenum, New York. DOI: 10.1007/978-1-4615-3042-8
- FAO 2010. FAO. 2010. Production Yearbook, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Roma, Italia.
- FAO 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Oportunidades y desafíos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. Roma
- FAO 2015. Producción de acuicultura 2014. World aquaculture production by species groups.
- FAO 2016. Medios-Noticias. 6 Julio 2016, Roma.
- FAO Stat – Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division. 2015. Food balance. Available at: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Accessed on: June 1, 2015.
- Félix M.J. 2007. Centro de validación y transferencia de tecnología de Sinaloa A.C. (CVTTS) y fundación produce Sinaloa A.C.
- Fernández-Gimenez A.V., Díaz A.C., Velurtas S.M., Fenucci J.L. 2009. *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of formulated feeds for *Artemesia longinaris* (Crustacea, *Penaeidae*). Brazilian Archives of Biology and Technology 52(6): 1379–1386.
- Francis G., Makkar H.P.S., Becker K., 2001. Effects of Quillaja saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 129:105–114. DOI: 10.1016/S1532-0456(01)00189-2.
- Freud R.J., Little R.C. 1981. SAS for linear models. A guide to ANOVA and GLM Procedures. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Frías J., Vidal C., Sotomayor C., Diaz C., Urbano G. 2000. Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpeas. European Food Research and Technology 210: 340–345.
- Fuentes-Arderiu X., Catiñeiras L.M.J., Queraltó C.J.M. 1998. Bioquímica clínica y patología molecular. Volumen II. 2da edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona.
- Furukawa A., Tsukahara H. 1966. On the acid digestion of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish 32: 502–506.
- García-Carreño F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): Their partial characterization, and the effect of feed on their composition.

- Comparative Biochemistry and Physiology Part B 103(3): 575–578. DOI: 10.1016/0305–0491(92)90373–Y
- García–Carreño F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* 3: 145–150.
- García–Ortega A., Verreth J., Segner H. 2000. Post–prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. *Fish Physiology and Biochemistry* 22(3): 237–244. DOI: 10.1023/A:1007893223006
- García–Ulloa M., Gallo–García M.C., Ponce–Palafox J.T., Rodríguez–González H., Góngora–Gómez A.M. 2013. Growth and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry fed with a dietary inclusion of decapsulated *Artemia* cysts. *Journal of Aquaculture In The Tropics* 28(1–4): 79–88.
- García–Uiras E. 2012. Ensilado de pescado adicionado con pasta de *Jatropha curcas* no tóxica como alternativa para la alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tesis de maestría del IPN. 37–50.
- Garzón S.M.L., Romero M.A., James M.G. 1993. Quitina y quitosano para uso farmacéutico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 24(4): 75.
- Gauthier S.F., Vachon C., Jones J.D., Savoie L. 1982. Assessment of protein digestibility by *in vitro* enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis. *Journal of Nutrition* 112(9): 1718–1725.
- Gerón L.J., Zeoula L.M., Vidotti R.M., Matsushita M., Kazama R., Caldas Neto S.F., Fereli F. 2007. Chemical characterization, dry matter and crude protein ruminal degradability and *in vitro* intestinal digestion of acid and fermented silage from tilapia filleting residue. *Animal Feed Science and Technology* 136: 226–239.
- Green S., Wiseman J., Cole D.J.A. 1988. Examination of stability, and its effect on the nutritive value, of fish silage in diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 21: 43–56.
- Givens D.I., Deaville E.R. 1998. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: A review. *Aust. Journal of Agricultural Research* 50(7): 1131–1145.
- Goddard J.S., Al–Yahyai D.S.S. 2001. Chemical and nutritional characteristics of dried sardine silage. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 10(4): 39–50.
- Goddard J.S., McLean E., Wille K. 2003. Co–dried sardine silage as an ingredient in tilapia, *Oreochromis aureus* diets. *Journal of Aquaculture In The Tropics* 18(3): 257–264.

- Goldenfarb P.B., Browyer F.P., Hall E.E., Brousius. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology* 56: 59–68.
- Goodno C.C., Swaisgood H.E., Catignani G.L. 1981. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Analytical Biochemistry* 115(1): 203–211.
- Grabner M., Hofer R. 1985. The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under *in vitro* conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 48(2): 111–122.
- Guerrero J.R., Ramirez A.L., Puente W. 2011. Caracterización del suero de queso blanco del combinado lácteo santiago. *Tecnología Química* 31(3): 93–100.
- Gupta Y.P. 1987. Antinutritional and toxic factors in food legumes: A review. *Plant Foods Hum Nutr.* 37: 201–217.
- Haard N.F., Chism G.W. 1998. Characteristics of Edible Plant Tissues, En “Food Chemistry”, pp. 952–953, Fennema O. R. (Ed) Marcel–Dekker, New York, EUA.
- Hahn D.H., Rooney L.W., Earp C.F. 1984. Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Food World*, 29: 776–779.
- Halver J.E., Hardy R.W. 2002. Fish nutrition, Third edition. Academic Press, New York. 824 pp.
- Hamdan M., Moyano F.J., Schuhardt D. 2009. Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(7): 1195–1201.
- He A., Ning L., Chen Y., Xing Q., Li J., Qiao F., Li D., Zhang M., Du Z. 2015. Systemic adaptation of lipid metabolism in response to low- and high-fat diet in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiological Reports* 3(8). DOI: 10.14814/phy2.12485
- Hemre G.I., Mommsen T., Kroghdahl Å. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8: 175–194.
- Henken A.M., Kleingeld D.W., Tijssen P.A.T. 1985. The effect of feeding level on apparent digestibility of dietary dry matter, crude protein and gross energy in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* 51: 1–11.
- Henry R.J., Cannon D.C., Winkelman J.W. 1974. In “Clinical Chemistry: Principles and Techniques”. Pp. 687–695. Harper and Row, New York.
- Hernández C., Olvera–Novoa M.A., Hardy R.W., Hermosillo A., Reyes C., González B. 2010. Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by–products meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance.

- Aquaculture Nutrition 16: 44–53.
- Hossain M.A., Jauncey K. 1993. The effects of varying dietary phytic acid, calcium and magnesium levels on the nutrition of common carp, *Cyprinus carpio*. In: RA, I.N. (Ed.), Fish Nutrition in Practice. IVth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, France, pp. 705–715.
- Jackson A.J., Capper B.S., Matty A.J. 1982. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia, *Sarotherodon mossambicus*. Aquaculture 27: 97–109.
- Jauncey K., Ross B. 1982. A Guide to Tilapia Feeds and Feeding. University of Sterling, Scotland.
- Job B.E., Antai E.E., Inyang–Etoh A.P., Otogo G.A., Ezekiel H.S. 2015. Proximate composition and mineral contents of cultured and wild tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Pisces: Cichlidae) (Linnaeus, 1758). Pakistan Journal of Nutrition 14(4): 195–200.
- Jobling M. 1995. Fish bioenergetics. Oceanographic Literature Review 9 (42): 785.
- Jones P.L., De Silva S.S. 1997. Influence of differential movement of the marker chromic oxide and nutrients on digestibility estimations in the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Aquaculture 154: 323–336.
- Jordal A.O., Torstensen B.E., Tsoi S., Tocher D.R., Lall S.P., Douglas S.E. 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Nutrition 135(10): 2355–2361.
- Jung W.J., Jo G.H., Kuk J.H., Kim K.Y. 2006. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. Tolerans KCTC–3074 and *Serratia marcescens* FS–3. Applied Microbiology and Biotechnology 71: 234–237.
- Jun–Sheng L., Jian–Lin L., Ting–Ting W. 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). Fish Physiology and Biochemistry 32(4): 295–303. DOI: 10.1007/s10695–006–9106–5
- Kats L.J., Neelsen J.L., Tokatch M.D., Goodband R.D., Weeden T.L., Dritz S.S. 1994. The effects spray–dried blood meal on growth performance of the early–weaned pig. Journal of Animal Science 72: 2860–2869.
- Kelley W.N. 1992. Medicina interna. Editorial médica panamericana. Hilarión Eslava 55, Madrid, Spain.
- Klaren P.H.M., Flik G., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E. 1993. Ca²⁺ transport across intestinal brush border membranes of the cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*. Journal of Membrane Biology 132 (2): 157–166. DOI: 10.1007/BF00239005

- Koolman J., Röhm K.H. 2004. Bioquímica. Texto y Atlas. 3ra edición. Editorial Panamericana S.A. Alemania.
- Köprücü K., Özdemir Y. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 250: 308–316.
- Kumar V., Makkar H.P.S., Becker K. 2011. Detoxified *Jatropha curcas* kernel meal as a dietary protein source. Growth performance, nutrient utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 17: 313–326.
- Lagler K.F., Bardach J.E., Miller R.R., Passino D.R.M. 1977. Capítulo 5. Alimentos, Digestión, nutrición y crecimiento. in: Ictiología. AGT editor S.A. 2DA EDICION.
- Lazo J.P., Davis D.A. 2000. Ingredient and feed evaluation. In: Stickney, R.R. (Ed.) *Encyclopedia of aquaculture*. John Wiley and Sons, New York, pp. 453–463.
- Leaver M.J., Villeneuve L.A., Obach A., Jensen L., Bron J.E., Tocher D.R., Taggart J.B. 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9: 299.
- Lehninger, A.L. 1984. Bioquímica. 2ªed. Omega. Barcelona, España. 1198 pp.
- Lee P.G., Lawrence A.L. 1997. Digestibility. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D. M. (Eds.), *Crustacean Nutrition, Advances in world aquaculture*, vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 194–260.
- Lemos D., Navarrete del Toro A., Córdova–Murqueta J.H., Garcia–Carreño F.L. 2004. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture* 239(1–4): 307–321.
- Lemos D., Lawrence A.L., Siccardi III A.J. 2009. Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH–stat degree of protein hydrolysis with species–specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 295(1–2): 89–98.
- Li S.N., Fan D.F. 1997. Activity of esterases from different tissues of freshwater fish and responses of their isoenzymes to inhibitors. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 51(2): 149–157. DOI: 10.1080/00984109708984018
- Li Y., Bordinhon A.M., Davis D.A., Zhang W., Zhu X. 2013. Protein: energy ratio in practical diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International* 21: 1109–1119.
- Li Y., Moreira–Bordinhon A., Allen–Davies D., Zhang W., Zhu X. 2012. Protein: energy ratio

- in practical diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International* 21: 1109–1119.
- López–Olmeda J.F., Madrid J.A., Sánchez–Vázquez F.J. 2006. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 144(2): 180–187. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.031
- López–Vásquez K., Castro–Pérez C.A., Val A.L. 2000. Circadian rhythms of the amylase activity in three Amazon fishes in their habitats. Pp. 85–90. *In: International Congress on the Biology of Fish Abstracts, Aberdeen, Scotland.*
- Lundstedt L.M., Melo J.F.B., Moraes G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 137: 331–339.
- Madage S.S.K., Medis W.U.D., Sultanbawa Y. 2015. Fish silage as replacement of fish fishmeal in red tilapia feeds. *Journal of Applied Aquaculture* 27 (2): 95–106.
- Makkar H.P.S., Becker K. 1997. Potential of *Jatropha curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints to its utilization. *Proceedings of the International Symposium on Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas and other Tropical Oil Seed Plants, February 23–27, 1997, Managua, México.*
- Makkar, H.P.S. Becker K. 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value–added coproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 773–787. DOI: 10.1002/ejlt.200800244.
- Márquez E., Bracho M., Archile A., Rangel L., Benítez B. 2005. Proteins, isoleucine, lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. *Food Chemistry* 93(3): 503–505.
- Márquez L., Overland M., Martínez–Llorens S., Morken T., Moyano F.J. 2013. Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 384–387: 46–55.
- Maynard L.A., Loosli J.K., Hintz H.F., Warner R.G. 1981. *Animal Nutrition*. McGraw–Hill Book Company, New York, NY.
- McGowan M.W., Artiss J.D., Standbergh D.R., Zack B. 1983. A peroxidase–coupled method for colorimetric determination of serum triglycerids. *Clinical Chemistry* 29: 538–525.
- Melo R.V., Cuamatzi T.Ó. 2007. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2da edición. Reverté ediciones, S.A. de C.V. México. Pp. 63.

- Mentón I., Caseras A., Cantó E., Fernández F., Baanante I.V. 1999. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly -fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Nutrient Gene Expression-Research Communication* 757–760.
- Metón I., Caseras A., Fernández F., Baanante I.V. 2004. Molecular cloning of hepatic glucose–6–phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 138: 145–153.
- Montoya A., López–Olmeda J.F., Yúfera M., Sánchez–Muros M.J., Sánchez–Vázquez F.J. 2010. Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 306(1–4): 315–321. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.06.023
- Moriarty D.J.W. 1973. The physiology of digestion of blue–green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *Journal of Zoology* 171(1): 25–39. DOI: 10.1111/j.1469–7998.1973.tb07514.x
- Nagase G. 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: Digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 49(3): 270–284. DOI: 10.1007/BF00298199
- Navarro–Guillén C., Moyano F.J., Yúfera M. 2015. Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* 435(1): 33–42. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.017
- Nestares T., Barrionuevo M., Urbano G., López–Frías M. 1999. Effect of processing methods on the calcium, phosphorus, and phytic acid contents and nutritive utilization of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2807–2812.
- Ng W.K., Hanim R. 2007. Performance of genetically improved Nile tilapia compared with red hybrid tilapia fed diets containing two protein levels. *Aquaculture Research* 38: 965–972.
- Nolasco H. 2008. Métodos utilizados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para la medición de digestibilidad *in vitro* para camarón. In: L. manual de metodologías de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para ingredientes y dietas para camarón (Cruz–Súarez, E., H. Villarreal–Colmenares, M. Tapia–Salazar, M.G. Nieto–Lopez, D.A. Villarreal–Cavazos and D. Ricque–Marie (eds), pp. 215–225. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, México.
- Nolasco–Soria H., Vega–Villasante F. 1998. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. Pp. 149–165. In: Civera–

- Cerecedo R., Pérez–Estrada C.J., Ricque–Marie D., Cruz–Suárez L.E. (eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV 2000. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15–18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Nolasco–Soria H., Vega–Villasante F. 2000. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. In: Civera–Cerecedo, R., C.J. Pérez–Estrada, D. Ricque–Marie and L.E. Cruz–Suárez (eds.). Avances en nutrición acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S., pp. 149–165.
- [NRC] National Research Council. 1983. Underutilized resources as animal, feedstuffs. National Academy Press, Washington, D.C., 253 p.
- [NRC] National Research Council. 1993. Committee on Animal Nutrition. Nutrient Requirements of Fish. Washington, DC, Natl Academy Press.
- NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington, DC.
- [AOAC] Official Methods of Analysis, 16th edition. 1995. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Obirikorang K.A., Amisah S., Fialor S.C., Skov P.V. 2015. Effects of dietary inclusions of oilseed meals on physical characteristics and feed intake of diets for the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Reports 1: 43–49. DOI: 10.1016/j.aqrep.2015.01.002.
- Ogello E.O., Munguti J.M., Sakakura Y., Hagiwara A. 2014. Complete replacement of fish meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) grow-out with alternative protein sources. A review. International Journal of Advanced Research 2 (8): 962-978.
- Ohlrogge J.B., Jaworski J.G. 1997. Regulation of fatty acid synthesis. Annual Review of Plant Biology 48: 109–136.
- Onishi T., Murayama S., Takeuchi M. 1973. Sequence of digestive enzyme levels in carp after feeding – I. Amylase and protease of intestinal content, hepatopancreas and gall bladder. Bull Tokai Registration Fish. Research Laboratory 75: 23–31.
- Onishi T., Murayama S., Takeuchi M. 1973. 1976. Changes in digestive enzyme levels in carp after feeding – III. Response of protease and amylase to twice-a-day feeding. Bull Japan Society Science Fish 42: 921–929.
- Ouellet D.R., Seoane J.R., Veira D.M., Proulx J.G. 1997. Effects of supplementation with fish meal or fish protein hydrolysate on growth, nutrient digestibility and rumen fermentation of growing cattle fed grass silage. Animal Feed Science and Technology 68: 307–326.

- Panserat S., Hortopan G.A., Plagnes–Juan E., Kolditz C., Lansard M., Skiba–Cassy S., Esquerre D., Geurden I., Médale F., Kaushik S., Corraze G. 2009. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294:123–131.
- Parada J., Aguilera J.M. 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science* 72(2): 21–32.
- Paredes–López O., Guevara–Lara F., Bello–Pérez L.A. 2006. Cap. III. Frijol. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Fondo de cultura Econonómica–Serie Ciencia para Todos. México, D.F., Pp: 59–81.
- Pedersen B., Eggum B.O. 1983. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH–stat procedure. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 49(1–5): 265–277.
- Peña–Díaz A., Arroyo B.Á., Gómez P.A., Tapia I.R., Gómez E.C. 2009. Bioquímica. 2da edición. Editorial limusa, S.A. de C.V. México, D.F. Pp. 283.
- Pérez R. 1995. Fish silages for feeding livestock. *World Animal Review* 82: 34–42.
- Pfaffl M.W. 2001. Development and validation of an externally standardised quantitative insulin like growth factor–1 (IGF–1) RT–PCR using LightCycler SYBR® Green I technology. In Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. (eds), *Rapid Cycle Real–time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, Germany pp. 281–291.
- Plascencia–Jatomea M., Olvera–Novoa M.A., Arredondo–Figueroa J.L., Hall G.M., Shirai K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 753–759. DOI: 10.1002/jsfa.1092.
- Pullin R.S.V., Lowe–McConnell R.H. 1982. The biology and culture of tilapias. International Center for Living Aquatic Resource Management. Manila, Philippines. Pp 181.
- Randall C.F., Bromage N.R., Thorpe J.E., Miles M.S., Muir J.S. 1995. Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out–of–phases photoperiods. *General and Comparative Endocrinology* 98(1): 73–86.
- Reiter R.J. 1993. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 49(8): 654–664. DOI: 10.1007/BF01923947
- Richardson N.L., Higgs D.A., Beames R.M., McBride J.R. 1985. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Nutrition* 115: 553–567.

- SAGARPA. 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca
- SAGARPA. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Artículos. Ganadería bovina y sus derivados. Publicado: 08 junio 2015.
- Salunkhe D.K., Jadhav S.J., Kadam S.S., Chavan J.K. 1982. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *CRC Critical Reviews in Food Sci and Nutr* 17: 277.
- Sambrook J., Maccallum P., Russel D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Springs Harbour Press, NY, ISBN 0-87969-577-3, p. 2344.
- Santos J.F., Castro P.F., Leal A.L.G., De Freitas Júnior A.C.V., Lemos D., Carvalho Jr. L.B., Bezerra R.S. 2013. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. *Aquaculture International* 21: 563-577. DOI: 10.1007/s10499-012-9589-2.
- Sanz F. 2009. La nutrición y alimentación en piscicultura. Volumen 1. Fundación Observatorio Española de Acuicultura. Pp 188.
- Sarac Z., Thaggard H., Saunders J., Gravel M., Neill A., Cowan R.T. 1993. Observations on the chemical composition of some commercial prawn feeds and associated growth responses in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 115: 97-110
- Sarmiento-Machado R.M., Cuevas-Rodríguez E., Mora-Rochín S., Mora-Escobedo R., Milán-Carrillo J., Reyes-Moreno C. 2006. Propiedades Nutricionales de Tempe de Garbanzo. Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica.
- Sathe S.K., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. 1985. Dry beans of *Phaseolus Areview*. Part 2. Chemical composition: Carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*. 21: 41.
- Saunders R.M., Connor M.A., Booth A.N., Bickoff E.M., Kohler G.O. 1973. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *Journal of Nutrition* 103(4): 530-535.
- Selle P.H., Ravindran V., Caldwell R.A., Bryden L.W. 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutrition Research Reviews* 113: 255-278.
- Sheng L.J., Lin L.J., Ting W.T. 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 23(4): 295-303. DOI: 10.1007/s10695-006-9106-5

- Shiau S.Y., Hsu C.Y. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* 210 (1–4): 335–342. DOI: 10.1016/S0044–8486(01)00853–5
- Shiau S.Y., Huang S.L. 1990. Influence of varying energy levels with two protein concentrations in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) reared in seawater. *Aquaculture* 91: 143–152.
- Shiau S.Y., Yu Y.P. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* 179: 439–446.
- SIAP. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Monografía del Frijol. Disponible en junio de 2009.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Monografía de coco. Disponible en junio de 2014.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance Nacional de Siembra y Cosecha. Disponible septiembre de 2016.
- Singh U., Jambunathan R. 1982. Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L). *Plant Foods for Human Nutrition* 31: 347–351.
- Sinha R., Radha C., Prakash J., Kaul P. 2007. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry* 101: 1484–1491.
- Sklan D., Prag T., Lupatsch I. 2004. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their prediction in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus* (Teleostei, Cichlidae). *Aquaculture Research* 35: 358–364.
- Smith S., Witkowski A., Joshi A.K. 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research* 42: 289–317.
- Snedecor G.W., Cochran W.G. 1981. *Statistical methods*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edn. Freeman, New York, NY, USA.
- Sousa R.M.R., Agostinho C.A., Oliveira F.A., Argentin D., Novelli P.K., Agostinho S.M.M. 2012. Productive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed at different frequencies and periods with automatic dispenser. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64 (1): 192–197. DOI: 10.1590/S0102–09352012000100027

- Spinelli J., Houle C.R., Wekell J.C. 1983. The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. *Aquaculture* 30: 71–83.
- Spinelli J., Lehman L., Wieg D. 1974. Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31(6): 1025–1029.
- Stickney R.R. 1996. Tilapia update, 1995. *World Aquaculture* 27(1): 45–50.
- Spreer D.E. 1991. *Lactología industrial*. Acribia: Zaragoza, pp.527–549.
- Swaigood H.E. 1996. Characteristics of milk. In: O Fennema (Ed), *Food Chemistry*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, pp. 842–878.
- Tacon A.G.J. 1993. Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. *FAO Fisheries Circular No.856*. FAO, Rome. 64pp.
- Tacon A.G.J., Akiyama D.M. 1997. Feed ingredients. In: D’Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*, vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 411–472.
- Tacon A.G.J., Hasan M.R., Metian M. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. Rome, Italy, *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 564* (87 pp.).
- Tacon A.G.J., Jackson A.J. 1985. Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G.(eds). *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 119–145.
- Takii K., Shimeno S., Takeda M. 1985. Changes in digestive enzyme activities in eel (*Anguilla japonica*) after feeding. *The agriculture, Forest and Fisheries Research Information Technology Center*.
- Tengjaroenkul B. 2000. Ontogenic morphology and enzyme activities of the intestinal tract of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Ph D Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Veterinary Medical Sciences. Blacksburg, Virginia, 176.
- Tengjaroenkul B., Smith B.J., Caceci T., Smith S.A. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182(3–4): 317–327. DOI: 10.1016/S0044–8486(99)00270–7
- Thongprajukaew K., Rodjaroen S., Yoonram K., Sornthong P., Hutcha N., Tantikitti C. Kovitvadh U. 2015. Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex

- reversed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 439: 45–52. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.01.021.
- Thorne P.J., Wiseman J., Cole D.J.A. 1990. Copra meal. P.A. Thacker, R.N. Kirkwood (Eds.), *Non-Traditional Feed Sources for Use in Swine Production*, Butterworth, London, pp. 127–134.
- Thresher W.C., Swaisgood H.E., Catignani G.L. 1989. Digestibilities of the protein in various foods as determined *in vitro* by an immobilized digestive enzyme assay (IDEA). *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 59–65.
- Tibbetts S.M., Verreth J.A.J., Lall S.P. 2011. *In vitro* pH-stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture* 319(3–4): 407–416.
- Toullec R., Mathieu C.M., Pion R. 1974. Utilisation des protéines du lactosérum par le veau préruminant à l'engrais. II. Digestibilité et utilisation pour la croissance. *Annales de Zootechnie* 23(1): 75–87.
- Trewevas E. 1983. Tilapiine Fishes of the genera sarotherodon, *Oreochromis* and Danakilia. British Museum of Natural History, Publication Number 878. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York. 583 p.
- Uchida K., Kajimura S., Riley L.G., Hirano T., Aida K., Grau E.G. 2003. Effects of fasting on growth hormone insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 134: 429–439.
- Ulloa M. Rosas U.P.R., Ramírez R.J.C., Ulloa R.B.E. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Cuerpo Académico de Tecnología de Alimentos U. A. de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas*.
- Usmani N., Jafri A.K. 2002. Influence of dietary phytic acid on growth, conversion efficiency, and carcass composition of Mrigal *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry. *Journal of the World Aquaculture Society* 33: 199–204.
- Valdez-González F., Gutiérrez-Dorado R., García-Ulloa M., Rodríguez-González H. 2013. Revisión del efecto de los antinutrientes y la fibra de leguminosas en la alimentación para peces. *Ciencia Nicolaita*. Núm. 59.
- Vega-Villasante F., Fernández I., Preciado R.M., Oliva M., Tovar D., Nolasco H. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* (Ordway, 1863) (Crustaceae: Decapoda: Portunidae). *Bulletin of Marine Science* 65(1): 1–9.

- Vega–Villasante F., Nolasco H., Adyary F., Carrillo–Farnes O. 2002. Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheidae) as potential feed additive, considerations for a new fishery along the México Pacific Coast. *Hidrobiológica* 12(2).
- Vega–Villasante F., Nolasco H., Civera R. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*—I. properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 106(3): 547–550. DOI: 10.1016/0305–0491(93)90130–W
- Vega–Villasante F., Nolasco H., Civera R. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Panaeus californiensis*—II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 112(1): 123–129.
- Vega–Villasante F., Nolasco H., Fallarero A., Carrillo–Farnes O. 2012. Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheidae) as potential feed additive, considerations for a new fishery along the México Pacific coast. *Hidrobiológica* 12 (2): 119–128.
- Vera L.M., De Oliveira C., López–Olmeda J.F., Ramos J., Mañanós E., Madrid J.A., Sánchez–Vázquez F.J. 2007. Seasonal and daily plasma melatonin rhythms and reproduction in Senegal sole kept under natural photoperiod and natural or controlled water temperature. *Journal of Pineal Research* 43(1): 50–55. DOI: 10.1111/j.1600–079X.2007.00442.x
- Vera Cruz E.M., Brown C.L. 2009. Influence of the photoperiod on growth rate and insulin-like growth factor-I gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 75: 130–141.
- Vera Cruz E.M., Brown C.L., Luckenbach J.A., Picha M.E., Bolivar R.B., Borski R.J. 2006. Insuline–like growth factor–I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapa, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 251: 585–595.
- Versaw W.K., Cuppett S.L., Winters D.D., Williams L.E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* 54(6): 1557–1558. DOI: 10.1111/j.1365–2621.1989.tb05159.x
- Versaw W.K., Cuppet S.L., Winters D.D., Williams L.E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* 54: 1557–1558.
- Vidotti R.M., Carneiro D., Macedo–Viegas E. 2002. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33(1): 57–62.

- Vidotti R.M., Macedo E.M., Carneiro D.J. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology* 105: 199–204.
- Vielma J., Makinen T., Ekholm P., Koskela J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183: 349–362.
- Villarreal H. 1995. Utilización de la langostilla en la acuicultura. Cap. 11. En *La Langostilla: Biología, ecología y aprovechamiento* eds. Auriolles–Gamboa, D. y E.F. Balart, pp 179–191.
- Villarreal H., Civera–Cerecedo R., Hernández–Llamas A. 2006. Effect of partial and total substitution of shrimp meal, fish meal and soy meal with red crab meal *Pleuroncodes planipes* (Stimpson) on the growth of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 37: 293–298.
- Voet D., Voet J.G. 2006. *Bioquímica*. 3ra edición. Buenos Aire: Médica Panamericana. Pp 533.
- Wei Q., Zhimin H. 2006. Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China* 3: 308–314.
- Wei Q., Zhimin H., Deqing S. 2003. Product distribution of casein tryptic hydrolysis based on HPSEC analysis and molecular mechanism. *Chemical Engineering Science* 58(3–6): 767–775.
- Xie F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology* 80(1): 75–84.
- Xiong Y., Huang J., Li X., Zhou L., Dong F., Ye H., Gan L. 2014. Deep sequencing of the tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver transcriptome response to dietary protein to starch ratio. *Aquaculture* 433: 299–306.
- Yang C.G., Wang X.L., Tian J., Liu W., Wu F., Jiang M., Wen H. 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real–time RT–PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* 527: 183–192.
- Yasumaru F., 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.
- Yúfera M., Moyano F.J., Astola A., Pousão–Ferreira P., Martínez–Rodríguez G. 2012. Acidic digestion in a teleost: Postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity,

and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. PLoS ONE 7 (3): e33687. DOI: 10.1371/journal.pone.0033687

Zadow J.G. 1992. Whey and lactose processing. Elsevier Science Publishers LTD: England, pp. 2–5.

Zhdanova I.V., Wang S.Y., Leclair O.U., Danilova N.P. 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. Brain Research 903(1–2): 263–268. DOI: 10.1016/S0006–8993(01)02444–1

11. ANEXOS

ANEXO A. Artículo científico generado del experimento I

CIRCADIAN CYCLE OF DIGESTIVE ENZYME PRODUCTION AT FASTING AND FEEDING CONDITIONS IN NILE TILAPIA, *OREOCHROMIS NILOTICUS* (ACTINOPTERYGII: PERCIFORMES: CICHLIDAE)

Magnolia MONTOYA-MEJÍA¹, Hervey RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ¹,
and Héctor NOLASCO-SORIA^{2*}

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), Unidad Sinaloa, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S., México

Montoya-Mejía M., Rodríguez-González H., Nolasco-Soria H. 2016. Circadian cycle of digestive enzyme production at fasting and feeding conditions in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Perciformes: Cichlidae). Acta Ichthyol. Piscat. 46 (3): 163–170

Background. Fish have photoperiod-dependent rhythms (circadian cycle of about 24 h), including the enzymatic secretion cycles, and this information has not been available for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). The knowledge on the digestive enzymes in Nile tilapia may have practical implications in fish nutrition. The aim of the presently reported study was to determine the circadian cycle of digestive enzyme production of Nile tilapia, in fasting and feeding regimes, in hope to receive information that might improve feeding schedules of this fish in aquaculture.

Materials and methods. In juvenile Nile tilapia the circadian cycle of concentrations of total soluble protein, protease, pepsin-like, trypsin, chymotrypsin, amylase, and lipase were determined. The baseline (fasting) and feeding conditions (ad libitum) were sampled and monitoring every hour for 24 h.

Results. The basal peak of enzyme activity in the intestine occurred at 18:44 h for amylase, at 19:57 h for proteases, and 20:29 for trypsin. The minimal activity for most enzymes, appeared between 4:51 h (amylase) and 10:13 h (lipases). In the feeding treatment (ad libitum), stomach activity (pepsin-like) had maximal activity at 20:06 h and minimal activity 05:46 h. Intestinal amylase activity covered an extended period of low enzymatic activity beginning at the 05:46 h and ending at 12:59 h. The peak of digestive enzyme activity occurred within 18:44–20:29 h. In general, secretion of digestive enzymes was positively stimulated by food, for all enzymes assayed.

Conclusion. Nile tilapia has a higher digestive enzyme activity at night than during the day. Knowledge of the circadian cycle of digestive enzymes, and modifications initiated by food, is useful to establish feeding times. If feeding schedules are adjusted to coincide with maximum natural peaks, feed efficiency will increase, which will be reflected in weight gain of the fish and provide more profitable yields for aquaculture.

Keywords: enzyme activity, physiology, feeding schedule

INTRODUCTION

The Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), is a freshwater, omnivorous cichlid fish native to Africa, but currently available worldwide (Eknath and Hulata 2009). It represents the second largest group of farmed fish, which production quadrupled within the past decade. Its rapid success as a useful food species has been related to a number of factors, such as: tolerance to overcrowding, rapid growth, high commercial value, stable market prices, relatively easy spawning in captivity throughout the year, high resistance to diseases, suitability for polyculture, and inexpensive diets of processed plant

sources (El-Sayed 1999, Shiao and Hsu 2002, Anonymous 2011).

To continue its rapid expansion, Nile tilapia farming must incorporate more sustainable practices, without compromising product quality and optimizing nutrient sources. The largest cost item of farming operations is the cost of fish feed. It is necessary to consider nutritional needs and factors that influence these requirements and implementation of the most appropriate feeding strategies. Digestive enzymes are among the most important factors influencing food consumption (Jun-Sheng et al. 2006). Several enzymes are involved in digestion in tilapia, such

* Correspondence: Dr. Héctor Nolasco Soria, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), calle IPN 195, La Paz, B.C.S. 23096, México, phone: +52-612-123-8484, e-mail: (HNS) hnolasco04@cibnor.mx, (MMM) m_magnolia@hotmail.com, (HRG) hrodriguez@ipn.mx.

as pepsin-like, amylase, trypsin, alkaline phosphatase, and esterase (Nagase 1964, Cockson and Bourne 1972, Moriarty 1973, Klaren et al. 1993, Li and Fan 1997, Tengjaroenkul et al. 2000). Circadian cycles are controlled by the timing of the light and dark phases; the pineal organ acts as a photo transducer, responsible for the regulation of the circadian clock of fish, conveying photoperiod information to the brain via neural pathways and release of indoleamines, primarily melatonin (Ekström and Meissl 1997). Melatonin cycles provide the animal with information about the time of day and also the time of year, synthesizing and releasing melatonin into the bloodstream during the dark phase (Reiter 1993). Although melatonin is synthesized in several tissues (Cassone 1990), its rhythmic synthesis is primarily localized in the pineal organ and the retina (Falcón et al. 1992, Cassone 1998). The photoperiod is the most important factor that entrains animal rhythms, including enzymatic secretion cycles, tied to the daily melatonin rhythms (Bromage et al. 2001). Fish exhibit photoperiod-dependent circadian cycles of several processes, including locomotion (zebrafish; Zhdanova et al. 2001), development (zebrafish; Danilova et al. 2004), growth (rainbow trout; Falcón et al. 2003), reproduction (salmon; Amano et al. 2000, 2004; Senegal sole; Vera et al. 2007), control and regulation of reproductive hormones and melatonin (European seabass; Bayarri et al. 2004), and digestive enzyme activity (Yúfera et al. 2012). Also, they have oscillators and circadian photo transduction drag mechanisms, suggesting that circadian pacemaker functions can be spread throughout the animal (zebrafish; Cahill 2002).

Understanding the circadian cycle of digestive enzymes can be used to optimize feeding schedules of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, under culture conditions.

MATERIALS AND METHODS

Fish rearing and sampling. Specimens of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, (70.9 ± 10.3 g) from the same progeny were cultivated at CIIDIR-IPN Mexico ($25^{\circ}32'41''\text{N}$, $108^{\circ}28'38''\text{W}$). Growing conditions were 14 h light : 10 h dark, $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, and >4 mg \cdot L⁻¹ dissolved oxygen, 250 fish per tank (5000 L), and provided a diet containing 30% crude protein fed ad libitum (Nutripec, Nutrimentos Purina, Guadalajara, Mexico).

Two experiments were performed to determine the circadian cycle of digestive enzyme activity:

- Basal circadian cycle established under fasting conditions; and
- Circadian cycle established with ad libitum feeding conditions.

Tilapias were kept 24 h fasting before being sampled. Random samples of 3 tilapias were collected every hour for 24 h ($n = 144$ fish; 72 per experiment) (Nolasco-Soria and Vega-Villasante 1998, Casillas-Hernández et al. 2006). The fish were sacrificed by immersion in cold water and then ice. Wet weight (± 0.0001 g) of the fish was recorded (EX324, Ohaus, Parsippany, NJ), stomach and intestine were removed, weighted, and individually stored at -20°C for air transport to facilities at CIBNOR for analysis. All

the work involving the use of the fish during his study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, CIIDIR-IPN Sinaloa.

Preparation of enzyme extracts. The wet weight (± 0.1 mg) of the stomach and intestines of each specimen was recorded (APX-200, formerly Denver Instrument, Sartorius, Göttingen, Germany). All samples were kept on ice during this procedure to reduce enzyme denaturation or damage. Stomachs and intestines were separated and then separately pooled with distilled water (tissue/distilled water, w/v 1 : 3) before being homogenized (Potter PRO 250, PRO Scientific, Oxford, CT). The mixtures were double centrifuged at $15\,294 \times g$ at 4°C for 10 min (5810-R, Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatants were stored at -20°C , for future analysis.

Enzyme activity analyses. The concentration of soluble protein in stomach and intestine extracts was determined (Bradford 1976), using bovine serum albumin (#A4503, Sigma-Aldrich) as a standard. Activity of acid proteases (pepsin-like) in the stomach extract was measured (Anson 1938) with slight modifications. In brief, the reaction mixture consisted of 1 mL of haemoglobin (#H2625, Sigma-Aldrich) (1% in glycine-HCl, 100 mmol \cdot L⁻¹ buffer, pH 2) and 20 μL of stomach multienzyme extract from tilapia, which was incubated at 25°C for 30 min. The reaction was stopped with 500 μL 20% trichloroacetic acid (TCA) and was left to stand at 4°C for 15 min. The samples were centrifuged at $15\,300 \times g$, under the same standing conditions. The supernatants were collected and diluted with distilled water (1 : 10) to take a reading of absorbance at 280 nm in a spectrophotometer (Jenway, Model 6405) using quartz cell (1 cm light path). One unit of activity was defined as the amount of enzyme needed to catalyse the liberation of an equivalent of 1 μmol tyrosine per minute.

Activity of the alkaline proteases in the intestine multi-enzyme extract was measured (García-Carreño 1992), using 500 μL of azocasein (#A2765, Sigma-Aldrich) (1% w/v, in Tris-HCl 100 mmol \cdot L⁻¹ buffer, pH 9), as substrate, 500 μL Tris-HCl (100 mmol + 10 mmol CaCl₂, pH 9.0) and 40 μL of intestine multi-enzyme extract from tilapia. The mixture was incubated at 25°C for 20 min. The reaction was stopped with 500 μL of 20% TCA. The samples were centrifuged and absorbance was read at 440 nm. One unit of alkaline protease activity was defined as the amount of enzyme required to increase 0.01 units Abs \cdot min⁻¹.

Trypsin activity was determined using specific substrate (#B4875, Sigma-Aldrich) (Erlanger et al. 1961), with slight modification. In brief, the reaction mixture consisted of 10 μL of intestine multi-enzyme extract from tilapia + 160 Tris-HCl (60 mmol, pH 8) + 10 μL calcium chloride (192 mmol Tris-HCl, 60 mmol, pH 8), starting the reaction with 10 μL BAPNA. The control was inactivated crude extract (water bath at 95°C for 5 min). Absorbance was measured at 405 nm every 15 s for 30 min. One unit of trypsin activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol 4-nitroaniline \cdot min⁻¹.

Chymotrypsin activity was determined (Del Mar et al. 1979), with slight modifications, as described for

trypsin, but using SAPNA (#S7388, Sigma-Aldrich) as the substrate in DMSO and 60 mmol Tris-HCl, pH 8 and CaCl_2 , pH 8. For controls, the crude extract was inactivated (water bath at 95°C for 5 min). One unit of chymotrypsin activity was defined as the enzyme required to release 1 μmol of 4-nitroanilide $\cdot \text{min}^{-1}$.

Lipase activity was determined using β -naphthyl caprylate as substrate (Versaw et al. 1989). The reaction mixture consisted of 100 μL sodium taurocholate (100 mmol), 1900 μL Tris HCl (200 mmol, pH 8), 10 μL enzyme extract and 10 μL β -naphthyl caprylate (#N8875, Sigma-Aldrich) (100 mmol in DMSO), as substrate. The mixture was incubated at 25°C for 9.5 min. Then 10 μL Fast Blue BB (100 mmol in DMSO) was added and the mixture was incubated at the same temperature for 0.5 min. The reaction was stopped by adding 200 μL 0.72 N TCA, then 2.70 mL reagent ethyl acetate-ethanol (1 : 1, v : v) was added, and the tubes were stirred in vortex. Absorbance was read at 540 nm. For the controls, the crude extract was applied after stopping the reaction with the TCA reagent. One unit of lipase activity was defined as the enzyme required to release 1 μmol of β -naphthol $\cdot \text{min}^{-1}$.

Amylase activity was determined using soluble starch (#S9765, Sigma-Aldrich) as substrate (Vega-Villasante et al. 1993). The reaction mixture contained 490 μL Tris HCl (50 mmol at pH 8), 10 μL enzyme extract, and 500 μL of the starch solution (1% Tris HCl, 100 mmol at pH 8), as substrate. The mixture was incubated at 25°C for 10 min, then 200 μL NaCO_3 (2 N) and 1500 μL dinitrosalicylic acid reagent (DNS) was added to stop the reaction. Colour development took place in water bath at 90°C for 15 min. Colour solution was diluted to 10 mL final volume. Absorbance at 540 nm was read. For the controls, the crude extract was applied after adding DNS reagent. One unit of amylase activity was defined as the enzyme required to release 1 μmol glucose $\cdot \text{min}^{-1}$.

The activity of proteases, lipases, and amylases are expressed as the number of units of enzyme per fish (total units; TU). All determinations were performed in quadruplicate. With these data for 24 h, regression analysis yielded a circadian cycle to represent the behaviour of each enzyme, to determine a straight-line behaviour and polynomial of second and third degree. Polynomial regression analysis generalizes analysis of covariance in nonlinear situations. The main advantage of this approach is to compare hourly enzyme activities (Draper and Smith 1981, Freud and Little 1981, Snedecor and Cochran 1981).

For these polynomials (linear equations, $P < 0.05$), patterns were calculated. To represent each enzyme, enzyme activity was averaged every two hours on the same graphics that show the polynomial lines.

Statistical analysis. Normality and variance homogeneity of data were analysed with the Lilliefors and Bartlett tests (Sokal and Rohlf 1995). Regression analysis was used to determine significance of the relation between TU and time. Linear regression and exponential and quadratic equations were used to represent the behaviour of each enzyme during the circadian cycle. When equation coefficients were

significant and residual variance of regression decreased, they were compared with simple linear regression. One-way ANOVA was used to test mean TU every two hours throughout the sampling, followed by post hoc Tukey's test was used to separate significantly different mean values and to compare treatments (starvation versus ad libitum feeding). Significance was set at $P < 0.05$. All analyses were performed with Statistica 7.0.

RESULTS

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, under starvation conditions increased pepsin-like activity with the time of day (Fig. 1). Alkaline proteases, trypsin, and amylase activity decline in the early hours of the morning and maximum activity at night (Figs. 2, 3). Chymotrypsin activity was not affected by phases of light and darkness. Lipase activity declined during midday (Fig. 4). Tilapia under ad libitum feeding conditions increased pepsin-like activities, had a secondary peak in the morning and a major peak at night (Fig. 1). Alkaline proteases, trypsin, chymotrypsin, and amylase maintained high activity at most hours, but lower activity at midday (Figs. 2, 3).

Enzyme activity is summarized in Table 1. Peak of enzyme activity in the intestine, appeared at 18:43:48 h for amylases, 19:57:36 h for proteases, and 20:29:24 h for trypsin; minimum activity 4:51:00 h for amylase, but 10:13:12 h for lipase.

Under standard feeding conditions, show pepsin-like activity in the stomach reached maximum activity at 20:06:00 h and minimum activity at 5:46:12 h. In the intestine, digestive enzyme activity had an extended period of low activity beginning at 5:46:12 h and ending at 12:58:48 h for amylase.

DISCUSSION

Basal digestibility (fasting conditions). The photoperiod is considered the most important factor entraining animal rhythms. In particular, melatonin rhythms provide animals

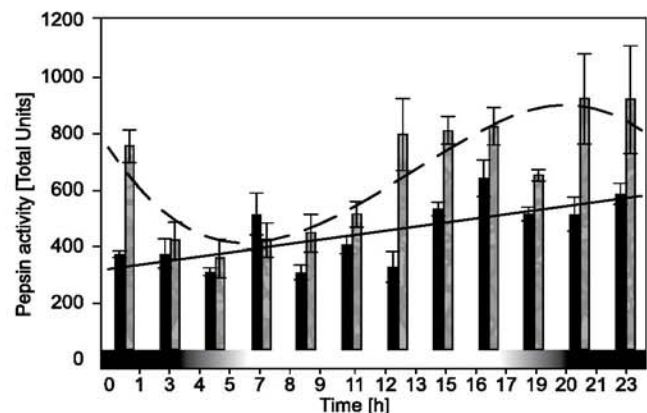


Fig. 1. Pepsin-like activity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; Black bars represent basal conditions (fasting fish) with solid line ($P < 0.05$); Marbled bars with dashed lines represent ad libitum feeding conditions ($P < 0.05$); Black section in the bar at the bottom of the figure represent night time; Values are mean \pm SE

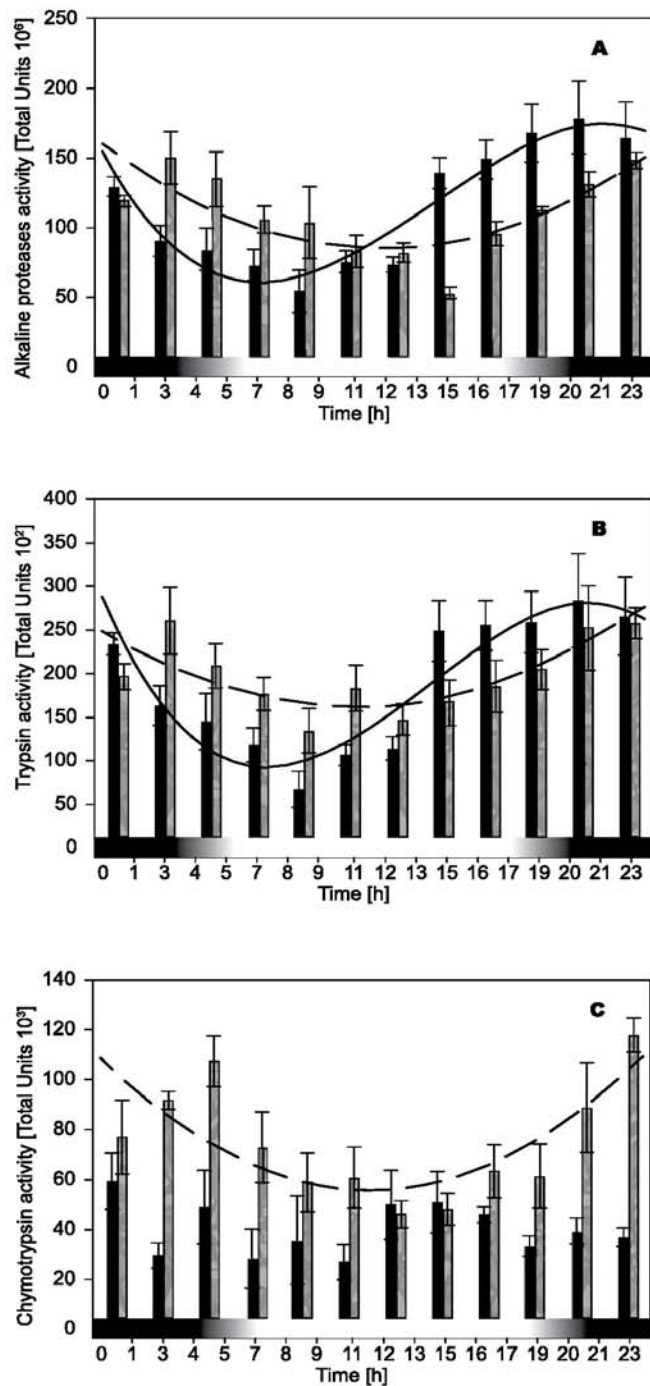


Fig. 2. Activity of alkaline proteases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, under fasting and ad libitum conditions (A); Trypsin-like activity (B), with same pattern as proteases Chymotrypsin-like activity (C) in tilapia fed ad libitum; Black bars represent basal digestive enzyme activity (fasting fish) and marbled bars represent activity of enzymes of tilapia fed ad libitum; Solid line represents the pattern of secretion under basal conditions and dashed line represents the enzyme pattern under ad libitum conditions ($P < 0.05$); Black section in the bar at the bottom of the figure represent night time; Values are mean \pm SE

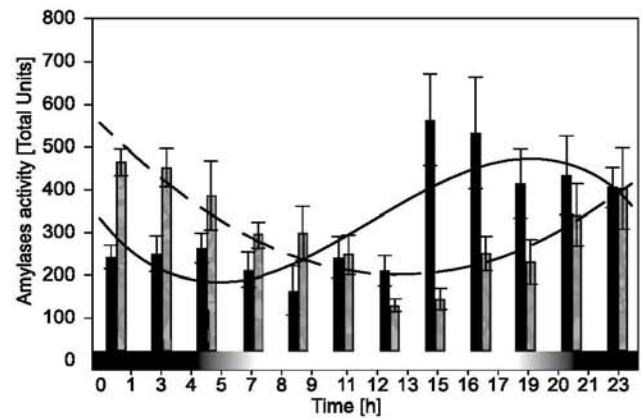


Fig. 3. Amylase activity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; Black bars represent basal (fasting) conditions with solid line ($P < 0.05$); marbled bars represent enzyme activity under ad libitum feeding conditions with dashed line ($P < 0.05$); Black section in the bar at the bottom of the figure represent night time; Values are mean \pm SE

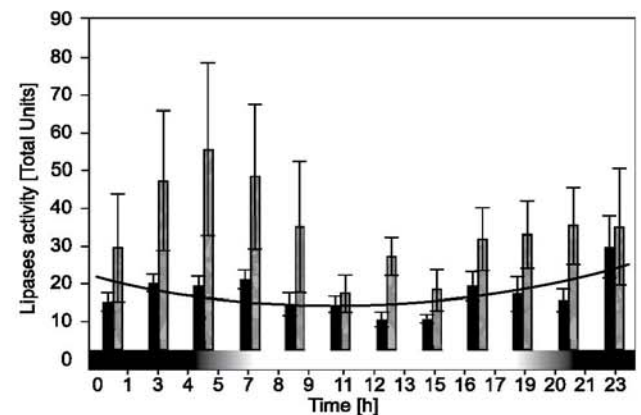


Fig. 4. Lipases activity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; Black bars represent basal (fasting) conditions with solid line ($P < 0.05$); marbled bars represent enzyme activity under ad libitum feeding conditions ($P < 0.05$); Black section in the bar at the bottom of the figure represent night time; Values are mean \pm SE

information about the time of day, synthesizing and releasing high levels of melatonin into the bloodstream during the night (Reiter 1993). The influence and control of these regulators on basal digestive enzyme secretion in fish has not yet been clarified. The majority of studies have related secretion of digestive enzymes to food stimuli in species-specific experiments. However, basal responses of fish should be determined, as well as responses to frequencies and feeding schedules. Boujard (1995) demonstrated that fish could be trained to feeding schedules; however, voluntary intake is reduced. As we expected, the circadian cycle of the digestive enzyme secretions in the tilapia under basal conditions was consistent with López-Olmeda et al. (2006). In general, low digestive enzyme secretions occur in the early morning, immediately before

Table 1Pattern of digestive enzymes during the circadian cycle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

Enzyme source	Enzyme	Conditions	Pattern equation	P values	Turning points	
					Max	Min
Stomach	Pepsin-like	Starvation	$y = 10.527x + 326.53$	0.000003		
		Ad libitum	$y = -0.3532x^3 + 13.706x^2 - 122.9x + 720.98$	0.002000	20:06:00	5:46:12
Intestine	Proteases	Starvation	$y = -75105x^3 + 3 \times 10^6 x^2 - 3 \times 10^7 x + 1 \times 10^8$	0.000060	19:57:36	6:40:12
		Ad libitum	$y = 502560x^2 - 1 \times 10^7 x + 2 \times 10^8$	0.000006		9:57:00
	Trypsin-like	Starvation	$y = -14.331x^3 + 585.88x^2 - 5958.9x + 27192$	0.000100	20:29:24	6:45:36
		Ad libitum	$y = 70.118x^2 - 1495x + 24224$	0.000400		10:39:36
	Chymotrypsin-like	Starvation				
		Ad libitum	$y = 377.3x^2 - 8673.9x + 105840$	0.000020		11:29:24
	Amylases	Starvation	$y = -0.214x^3 + 7.5695x^2 - 58.317x + 308.64$	0.009000	18:43:48	4:51:00
		Ad libitum	$y = 2.0381x^2 - 52.917x + 540.82$	0.000000		12:58:48
	Lipases	Starvation	$y = 0.0748x^2 - 1.5284x + 21.353$	0.006000		10:13:12
		Ad libitum				

sunrise, remaining at this level during most of the day until late afternoon. Digestive enzyme activity starts at sunset. Since the majority of basal enzymatic secretions occur at night, feeding strategies can be modified to take advantage of high-level enzyme secretion. Or changing the photoperiods will change melatonin level (Randall et al. 1995), which will synchronize feeding times with cyclic secretion of digestive enzymes to provide better and faster hydrolysis and increased feed efficiency. López-Vásquez et al. (2000) suggest that when amylase activity is highest, about two hours before food intake, then it is practical to start the feeding period at the peak of maximum of trypsin secretion. In larvae of the north African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), that were fed one meal a day, protease activity increased after feeding and reached a peak 12 h after food was supplied, while no significant change in enzymatic activity occurred in starved catfish larvae (García-Ortega et al. 2000).

Circadian enzyme activity with feeding stimulation.

In vertebrates, after food intake, several neural and hormonal mechanisms are activated that mediate postprandial secretion, to stomach distension, and nutrients in the small intestine. Both systems contribute precise adjustments of the secretory response to increase efficient food digestion (Kelley 1992). Montoya et al. (2010) demonstrate that altering feeding time affects the physiology and behaviour of gilthead seabream, *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, where they modify their secretory capacity to prepare themselves for a forthcoming meal. For example, amylase and alkaline protease activity increased some hours before mealtime in periodic feeding, whereas in random feeding, amylase activity increased 1 h after feeding and alkaline

protease showed no statistically significant differences. Acid protease activity was not significantly different in any group. Navarro-Guillén et al. (2015), studying food intake and digestive enzyme production of post-metamorphic larvae of Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup, 1858, demonstrated that larvae has the higher food intake during the night, but continued to feed during the day, they also found that lipase activity increased before feeding, however trypsin activity was constant during the day.

In our study, tilapia digestive activity in the feeding treatment was higher than activity found under fasting basal conditions (difference was statistically significant). Under basal conditions the enzymatic activity showed minimum (at noon) and maximum (at night) peaks. Under ad libitum conditions, enzyme activities were maintained at high level, with a slight decrease at noon, but both experiments showed a markedly high nocturnal enzymatic activity. Sousa et al. (2012), however, compared night-, daytime-, and mixed feeding schedules, getting lower feed efficiency at night, because of that they proposed to optimize feeding offering feed before the sunset, to close-synchronize the moment of the highest digestive enzymes activity with the filling of gastrointestinal tract of fish.

CONCLUSIONS

Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*, have circadian natural rhythms for digestive enzyme activity, regulated by endogenous systems, and which can be measured under fasting conditions. The natural rhythms may be stimulated by food, increasing digestive enzyme activity. If feeding schedules are adjusted to coincide with maximum natural peaks, feed efficiency will increase, which will be reflected

in weight gain of the fish and provide more profitable yields for aquaculture. Nile tilapia has a higher digestive enzyme activity at night than during the day.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Patricia Hinojosa Baltazar at CIBNOR for technical assistance. Ira Fogel at the CIBNOR provided extensive editorial assistance. The funding was provided by the CIBNOR (AC 0.24) and the Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN 20141467; 20150267). M.M.M. is a recipient of a doctoral fellowship from the CONACYT (grant 356758). H.R.G. is a fellow of the COFAA and the EDI of the Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCES

- Amano M., Iigo M., Ikuta K., Kitamura S., Okuzawa K., Yamada H., Yamamori K.** 2004. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zoological Science of Japan* **21** (1): 79–85.
DOI: 10.2108/zsj.21.79
- Amano M., Iigo M., Ikuta K., Kitamura S., Yamada H., Yamamori K.** 2000. Roles of melatonin in gonadal maturation of underyearling precocious male masu salmon. *General and Comparative Endocrinology* **120** (2): 190–197.
DOI: 10.1006/gcen.2000.7547
- Anonymous** 2011. *World Aquaculture 2010*. FAO Fisheries and Aquaculture Department. FAO, Rome.
- Anson M.L.** 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* **22** (1): 79–89.
DOI: 10.1085/jgp.22.1.79
- Bayarri M.J., García-Allegue R., López-Olmeda J.F., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J.** 2004. Circadian melatonin release in vitro by European sea bass pineal. *Fish Physiology and Biochemistry* **30** (1): 87–89.
DOI: 10.1007/s10695-004-6002-8
- Boujard T.** 1995. Diel rhythms of feeding activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiology and Behavior* **58** (4): 641–645.
DOI: 10.1016/0031-9384(95)00109-V
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1–2): 248–254.
DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bromage N.R., Porter M.J.R., Randall C.F.** 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* **197** (1–4): 63–98.
DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00583-X
- Cahill G.M.** 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell and Tissue Research* **309** (1): 27–34.
DOI: 10.1007/s00441-002-0570-7
- Casillas-Hernández R., Nolasco-Soria H., Lares-Villa F., García-Galano T., Carrillo-Farnes O., Vega-Villasante F.** 2006. Ritmo circadiano de la actividad enzimática digestiva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su efecto en el horario de alimentación. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* **2** (2): 55–64.
- Cassone V.M.** 1990. Melatonin: time in a bottle. Pp. 319–367. *In: Milligan S.R.* (ed.) *Oxford Reviews of Reproductive Biology* Vol. 12. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Cassone V.M.** 1998. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiology International* **15** (5): 457–473.
DOI: 10.3109/07420529808998702
- Cockson A., Bourne D.** 1972. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **41** (1): 715–718.
DOI: 10.1016/0300-9629(72)90335-0
- Danilova N., Krupnik V.E., Sugden D., Zhdanova I.V.** 2004. Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *FASEB Journal* **18** (6): 751–753.
DOI: 10.1096/fj.03-0544fje
- Del Mar E.G., Brodrick J.W., Geokas M.C., Largman C.** 1979. Effect of oxidation of methionine in a peptide substrate for human elastases: A model for inactivation of α_1 -protease inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **88** (2): 346–350.
DOI: 10.1016/0006-291X(79)92054-0
- Draper N.R., Smith H.** 1981. *Applied regression analysis*. 2nd edn. John Wiley and Sons, New York, NY, USA.
- Ekmath A.E., Hulata G.** 2009. Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Reviews in Aquaculture* **1** (3–4): 197–213.
DOI: 10.1111/j.1753-5131.2009.01017.x
- Ekstrzm P., Meissl H.** 1997. The pineal organ of teleost fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7** (2): 199–284.
DOI: 10.1023/A:1018483627058
- El-Sayed A.F.M.** 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* **179** (1–4): 149–168.
DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00159-3
- Erlanger B.F., Kokawsky N., Cohen W.** 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **95** (2): 271–278.
DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X
- Falcón J., Besseau L., Fazzari D., Attia J., Gaildrat P., Beauchaud M., Boeuf G.** 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* **144** (10): 4648–4658.
DOI: 10.1210/en.2003-0707
- Falcón J., Thibault C., Begay V., Zachmann A., Collin J.P.** 1992. Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. Pp. 167–198. *In: Ali, M.A.* (ed.) *Rhythms in fishes*. Plenum, New York.
DOI: 10.1007/978-1-4615-3042-8

- Freud R.J., Little R.C.** 1981. SAS for linear models. A guide to ANOVA and GLM Procedures. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- García-Carreño F.L.** 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): Their partial characterization, and the effect of fed on their composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **103** (3): 575–578.
DOI: 10.1016/0305-0491(92)90373-Y
- García-Ortega A., Verreth J., Segner H.** 2000. Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of Artemia. *Fish Physiology and Biochemistry* **22** (3): 237–244.
DOI: 10.1023/A:1007893223006
- Jun-Sheng L., Jian-Lin L., Ting-Ting W.** 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **32** (4): 295–303.
DOI: 10.1007/s10695-006-9106-5
- Kelley W.N.** 1992. Medicina interna. Editorial médica panamericana. Hilarión Eslava 55, Madrid, Spain.
- Klaren P.H.M., Flik G., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E.** 1993. Ca²⁺ transport across intestinal brush border membranes of the cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Membrane Biology* **132** (2): 157–166.
DOI: 10.1007/BF00239005
- Li S.N., Fan D.F.** 1997. Activity of esterases from different tissues of freshwater fish and responses of their isoenzymes to inhibitors. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **51** (2): 149–157.
DOI: 10.1080/00984109708984018
- López-Olmeda J.F., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J.** 2006. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **144** (2): 180–187.
DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.031
- López-Vásquez K., Castro-Pérez C.A., Val A.L.** 2000. Circadian rhythms of the amylase activity in three Amazon fishes in their habitats. Pp. 85–90. *In: International Congress on the Biology of Fish Abstracts*, Aberdeen, Scotland.
- Montoya A., López-Olmeda J.F., Yúfera M., Sánchez-Muros M.J., Sánchez-Vázquez F.J.** 2010. Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **306** (1–4): 315–321.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.06.023
- Moriarty D.J.W.** 1973. The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *Journal of Zoology* **171** (1): 25–39.
DOI: 10.1111/j.1469-7998.1973.tb07514.x
- Nagase G.** 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: Digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **49** (3): 270–284.
DOI: 10.1007/BF00298199
- Navarro-Guillén C., Moyano F.J., Yúfera M.** 2015. Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* **435** (1): 33–42.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.017
- Nolasco-Soria H., Vega-Villasante F.** 1998. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. Pp. 149–165. *In: Civera-Cerecedo R., Pérez-Estrada C.J., Ricque-Marie D., Cruz-Suárez L.E. (eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV 2000. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15–18, 1998, La Paz, B.C.S., México.
- Randall C.F., Bromage N.R., Thorpe J.E., Miles M.S., Muir J.S.** 1995. Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-of-phase photoperiods. *General and Comparative Endocrinology* **98** (1): 73–86.
DOI: 10.1006/gcen.1995.1045
- Reiter R.J.** 1993. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* **49** (8): 654–664.
DOI: 10.1007/BF01923947
- Shiau S.Y., Hsu C.Y.** 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* **210** (1–4): 335–342.
DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00853-5
- Snedecor G.W., Cochran W.G.** 1981. *Statistical methods*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.
- Sokal R.R., Rohlf F.J.** 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edn. Freeman, New York, NY, USA.
- Sousa R.M.R., Agostinho C.A., Oliveira F.A., Argentim D., Novelli P.K., Agostinho S.M.M.** 2012. Productive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed at different frequencies and periods with automatic dispenser. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **64** (1): 192–197.
DOI: 10.1590/S0102-09352012000100027
- Tengjaroenkul B., Smith B.J., Cacci T., Smith S.A.** 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* **182** (3–4): 317–327.
DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00270-7
- Vega-Villasante F., Nolasco H., Civera R.** 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*—I. properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **106** (3): 547–550.
DOI: 10.1016/0305-0491(93)90130-W
- Vera L.M., De Oliveira C., López-Olmeda J.F., Ramos J., Mañanós E., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J.** 2007. Seasonal and daily plasma melatonin rhythms and reproduction in Senegal sole kept under natural photoperiod and natural or controlled water temperature. *Journal of Pineal Research* **43** (1): 50–55.

- DOI: 10.1111/j.1600-079X.2007.00442.x
- Versaw W.K., Cuppett S.L., Winters D.D., Williams L.E.** 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* **54** (6): 1557–1558.
DOI: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb05159.x
- Yúfera M., Moyano F.J., Astola A., Pousão-Ferreira P., Martínez-Rodríguez G.** 2012. Acidic digestion in a teleost: Postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS ONE* **7** (3): e33687.
DOI: 10.1371/journal.pone.0033687
- Zhdanova I.V., Wang S.Y., Leclair O.U., Danilova N.P.** 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Research* **903** (1–2): 263–268.
DOI: 10.1016/S0006-8993(01)02444-1

Received: 13 May 2016

Accepted: 18 August 2016

Published electronically: 30 September 2016

ANEXO B. Artículo científico generado de digestibilidad *in vitro*

***IN VITRO* DIGESTIBILITY OF FEED BY-PRODUCT INGREDIENTS WITH
POTENTIAL IN TILAPIA AQUACULTURE**

Magnolia Montoya-Mejía¹, Hervey Rodríguez-González¹, Hector Nolasco-Soria^{2*}

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), Unidad Sinaloa, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, Mexico

m_magnolia@hotmail.com; hrodriguezg@ipn.mx

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S., Mexico

*Corresponding author: Héctor Nolasco Soria, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Calle IPN 195, La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

Tel: +52-612-123-8484, hnolasco04@cibnor.mx.

***In vitro* digestibility of feed by-product ingredients with potential in tilapia
aquaculture**

ABSTRACT

Aquaculture is currently based on manufacturing high quality and low cost foods. It is necessary to find effective and practical methods that allow diversification of ingredients used in formulations, by appropriate selection for each species. Ingredient and diet digestibility was measured by the amount of released amino acids, after acid and alkaline digestion. All diets, including the animal or plant ingredients, were more digestible than the reference diet containing fish meal ($p < 0.05$). The highest digestibility of the animal ingredients were bovine blood and whey red crab meal and fish silage were closer to the reference diet ($p < 0.05$). The highest digestibility occurred with bovine blood (641.4 $\mu\text{mol/g}$), and the lowest with chickpea (33.7 $\mu\text{mol/g}$). These results suggest that pre-treated plant and animal by-products can be used as a protein source in formulating feed for tilapia.

Keywords: digestion, feedstuff, pH-stat, digestive enzymes, *Oreochromis niloticus*.

INTRODUCTION

Food suppliers to aquaculture face the challenge of finding alternative sources of protein to replace fish meal, that is economically viable and of high quality nutrition to formulate diets. Aquafeed manufacturing requires flexibility in formulations, based on the input of nutrients from food ingredients and additives to substitute for scarce raw materials and avoid fluctuations in cost and availability (Tacon *et al.*, 2011); an alternative is the use of agroindustrial byproducts. New ingredients are continually analyzed by practical and efficient methods to determine digestibility and nutritional value for the species of interest. *In vitro* digestibility in pH-stat closed systems is based on the hydrolysis of peptide bonds by the action of proteolytic enzymes and measuring protons released, by consuming hydroxide to keep the pH constant (Wei *et al.*, 2003; Wei and Zhimin, 2006), or by measuring the free amino acids released by protease hydrolysis (Hamdan *et al.*, 2009), which provides an estimate of the number of peptide bonds hydrolyzed during the reaction time (Nolasco, 2008). Determination of *in vitro* digestibility by the pH-stat method with specific enzymes of each species has been investigated in *Salmon gairdneri* (Dimes and Haard, 1994); salmonids (El-Mowafi *et al.*, 2000); *Argyrosomus regius*, *Dicentrarchus labrax*, and *Oreochromis niloticus* (Hamdan *et al.*, 2009); *Oncorhynchus mykiss*, *Rachycentron canadum*, and *Oreochromis niloticus* (Yasumaru and Lemos, 2014); *Gadus morhua* (Tibbetts *et al.*, 2011), and *Litopennaeus vannamei* (Ezquerria *et al.*, 1998; Córdoba-Murueta and García-Carreño, 2002; Lemos *et al.*, 2009), with a significant potential to distinguish food quality and predict digestibility of protein in the living marine animal. In our study, the ingredients and diets based on by-products of animal and plant origin and fish meal replacement options for tilapia, by *in vitro* digestibility was determined.

MATERIALS AND METHODS

Fish sampling

Tilapia (70.9 ± 10.3 g) were cultivated in CIIDIR facilities at Guasave, Sinaloa, Mexico ($25^{\circ}32'41''\text{N}$, $108^{\circ}28'38''\text{W}$). Ambient conditions were 14 h light:10 h dark, 27 ± 1 °C, and >4 mg L⁻¹ dissolved oxygen, with 250 fish per 5000 L tank that were provided a diet containing 30% crude protein fed *ad libitum* (Nutripec, Nutrimentos Purina, Guadalajara, Mexico).

Before sampling, tilapia fasted for 24 h. Random sampling (144 fish) was done each hour for 24 h to determine circadian cycle of digestive enzymatic activity (Nolasco-Soria and Vega-Villasante, 2000; Casillas-Hernández *et al.*, 2006) to select schedules with higher digestive enzyme production as a baseline (fasting) and select sampling times for obtaining the products of their digestive system for preparing enzyme reagents. Tilapia were killed by immersion in ice cold water and then in ice. The weight of the animals, stomach, and intestine was recorded and the parts were individually stored at -20 °C until used.

Crude digestive enzyme extract

Wet weight (± 0.1 mg) of the stomach and intestines of each specimen was recorded; all samples were kept on ice during this procedure to reduce enzyme denaturation or damage. Stomachs and intestines were separated, and then separately pooled with distilled water (tissue/distilled water, w/v 1:3) before being homogenized (Potter PRO 250, PRO Scientific, Oxford, CT). The mixtures were double centrifuged at $15,294 \times g$ at 4 °C for 10 min. The pH of the crude enzyme extracts were measured at 0.1 °C and adjusted to pH 2.0 in stomach extracts by adding 0.1 N HCl and to pH 8.0 in pyloric caeca and intestine extracts by adding 0.1 N NaOH under constant agitation on ice to maintain 4 °C and reduce enzyme autohydrolysis. Enzyme extracts were aliquoted in 2 mL polypropylene cryogenic vials and stored at -20 °C until used.

Digestive enzyme reagent preparation

The digestive enzyme reagent was prepared, using fish killed at the peak hour for proteolytic activity (19 h), according to circadian activity of acidic pepsin, and 23 h, according to circadian activity of alkaline protease. A pool of stomachs and pyloric caeca-intestines respectively (15 tilapia, 88.2 ± 13.5 g) was prepared to use the same enzyme reagent for all *in vitro* digestibility tests. Acidic protease activity in extracts of stomach was done according to Anson (1938), using hemoglobin (#H2625, Sigma-Aldrich) as a 0.5% substrate. One acidic protease unit was defined as the amount of enzyme required for releasing μmol tyrosine equivalent per minute. In pyloric caeca-intestine extracts, general proteases were quantified according to Vega-Villasante *et al.* (1995), using 1% azocasein (#A2765, Sigma-Aldrich) as substrate. One protease unit was defined as the amount of enzyme required for increasing 0.01 absorbance units at 440 nm for min.

***In vitro* digestibility assays**

In vitro digestion was divided into two parts (Yasumaru and Lemus, 2014). The first digestion, as in tilapia, was acid digestion with enzymes of the stomach at pH 2.0 as follows: The acid phase was simulated by suspending a given amount of the desired substrate (6.25 mg protein of feed / mL reaction, 10 mL total volume) in 1 mol L^{-1} HCl at pH 2.0 to start digestion; 29.5 pepsin-like units were added (acid digestive enzyme reagent from tilapia stomach), and incubated for 30 min at 37°C with constant stirring at 120 rpm. After 30 min, the pH was raised to 8.0 by adding 1 mol L^{-1} NaOH and transferring the mixture to the pH-stat titration system (842 Titrand, Metrohm, Herisau, Switzerland), connected to a controller and Tiamo 2.2 software, Metrohm) for dosing NaOH, according to the release of protons by the hydrolytic action of the peptide bonds of proteins and peptides, keeping constant pH. The second digestion was started by adding 11.0 protease units (alkaline digestive enzyme reagent from the tilapia pyloric caecum) and maintained for 60 min. Results were expressed either as total amount of amino acids released at each sampling point or as the accumulated values of amino acid released until the moment of sampling.

Initial free amino acid content of ingredients and diets before acid digestion was determined at time zero (immediately before adding the acid digestive enzyme

reagent) and at the end of acid digestion, once the NaOH was added and the reaction was stopped; the final free amino acid content was also measured. Free amino acid were quantified by using OPA spectrophotometry (Church *et al.*, 1983): The OPA reagent was prepared daily according to Goodno *et al.* (1981). Acid digestibility was determined by the amount of amino acids released by acid digestive enzymes; alkaline digestibility was determined by the amount of amino acids released by alkaline digestive enzymes; total digestibility was determined by total amino acid released during both kinds of digestion (Hamdan *et al.* 2009).

Ingredients

The tested ingredients were fish silage (FS), red crab meal (RC), bovine blood (BB), whey (WH), extruded chickpea (EC), chickpea (CH), extruded bean (EB), coconut meal (CM), and *Jatropha* meal (JM). The experimental diets (Table 1) were the reference diet (RE) with fish meal (as reference ingredient, RI alone) or nine additional diets with 30% inclusion of the test ingredients. The experimental diets contained inert Cr₂O₃ (for use in another trial); its presence is not an influential factor in *in vitro* digestibility studies. The ingredients were obtained from commercial warehouses or prepared at laboratories (CIIDIR-IPN, CIBNOR). Proximate composition (moisture, crude protein, fat, crude fiber, and ash) diets (Table 1) and ingredients (Table 2), was determined according to standard methods (AOAC 2005).

Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate. Results of the experiments were presented as the total amount of amino acids released during each digestion step or accumulated values of amino acids released after acid and alkaline digestion. The rate of amino acid releasing by enzymatic hydrolysis, for time unit. Data were analyzed using Statistica (Dell Statistica). Ingredients and diet data from stomach acid digestion; pyloric caeca/intestine alkaline digestion, and total two-stage digestion were submitted to one-way ANOVA. Ingredient and diet data of the two Nile tilapia farming systems were compared using Student's *t*-test. Difference between means was detected with Tukey's test, with significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

Acid pepsin-like activity was 397.82 U/mg protein and alkaline protease activities was 78.10 U/mg protein. The amount of free amino acids (leucine equivalents) in the experimental diets before digestion, at time zero, ranged from 193.2 $\mu\text{M/g}$ (FS diet) to 121.9 $\mu\text{M/g}$ (CM diet). In the tested ingredients, it ranged from 361.0 $\mu\text{M/g}$ (RI diet) to 26.8 $\mu\text{M/g}$ (CM diet).

The results of acidic digestibility tests indicate that the amounts of released amino acids ranged from 69.9 $\mu\text{M/g}$ (WH diet) to 29.2 $\mu\text{M/g}$ (CH diet). Alkaline digestibility ranged from 113.8 $\mu\text{M/g}$ (BB diet) to 26.0 $\mu\text{M/g}$ (EB diet). The acidic digestibility test released amino acids ranging from 101.9 $\mu\text{M/g}$ (WH diet) to 17.2 $\mu\text{M/g}$ (CH diet); the alkaline digestibility test ranged from 589.6 $\mu\text{M/g}$ (BB diet) to 13.7 $\mu\text{M/g}$ (RC diet) (Table 3).

Overall, digestibility of diets including animal ingredients were higher than digestibility of the reference diet ($p < 0.05$), the most digestible diet included dairy whey (WH) (Figure 1). Diets with plant ingredients were as digestible as the reference diet, except, the CM and JM diets, which was more digestible than all other plant ingredients ($p < 0.05$) (Figure 2). The highest digestibility of the animal ingredients were the BB and WH ingredients; the RC and FS ingredients were similar to the reference ingredient (fish meal) ($p < 0.05$) (Figure 3). All plants ingredients had lower digestibility than the reference ingredient (RI) ($p < 0.05$). The JM ingredient had the highest and the CH ingredient had the lowest digestibility ($p < 0.05$) (Figure 4).

DISCUSSION

Efficient and rapid tools to determine bioavailability of nutrients of raw materials in tilapia aquaculture are required to achieve flexible, nutritional, and cost effective diet formulas. *In vivo* and *in vitro* methods can be used to measure bioaccessibility of nutrients, through enzyme digestion to estimate digestibility (Parada and Aguilera, 2007). *In vitro* digestibility of feedstuff has been used to predict *in vivo* digestibility. Many studies on *in vitro* digestibility use specific digestive enzyme reagents from

experimental organisms, at required conditions (Dimes and Haard, 1994; Lemos *et al.*, 2004; Nolasco, 2008; Hamdan *et al.*, 2009; Márquez *et al.*, 2013). In our study, digestibility was tested in two steps, first the acid digestibility and then the alkaline digestibility, to obtain total digestibility; then using the tilapia enzymes to perform the *in vitro* test as occurs in tilapia fish, as proposed by Clements and Raubenheimer (2005) and Hamdan *et al.* (2009). Acid digestibility of proteins is very important by increasing the speed of intestinal hydrolysis, leading to a significant shift from soluble polypeptides to oligo- and dipeptides and free amino acids, as reported by Grabner and Hofer (1985) and potentially increasing protein availability from alkaline digestion of soluble protein by acid and digestive inactivation and destruction of protease inhibitors, as proposed by Hamdan *et al.* (2009) and Pedersen and Eggum (1983). *In vivo* trials are complex, labor-intensive, time-consuming, and not suitable for quality control at the industrial level (Lee and Lawrence, 1997; Givens and Deaville, 1998; Lazo and Davis, 2000; Castillo *et al.*, 2002). In our study, all the ingredients were first digested by stomach enzymes at acidic pH, which in general terms, was much lower than hydrolysis achieved in the alkaline digestion. Yasumaru and Lemos (2014) report an increase in the degree of hydrolysis for most of the tested ingredients when first treated with acidic stomach enzymes prior to alkaline hydrolysis with pyloric caeca/intestine enzymes (two digestion phases).

Several authors assumed that the pH-stat method increases accuracy of digestibility by the degree of hydrolysis of the plant versus animal ingredients, such as in salmonides (Haard, 1993; *Sparus aurata* (Alarcón *et al.*, 2002); penaeids (Fernández-Gimenez *et al.*, 2009); and *Gadus morhua* (Tibbetts *et al.*, 2011), it is not comparable to our study because no acid digestion tests were performed.

The animal ingredients had higher alkaline than acid hydrolysis, except for red crab meal. Red crab meal is known for its high content of chitin (Spinelli *et al.*, 1974). Danulat and Kausch (1984) demonstrated that chitinase activity in the gadoid pyloric caeca is lower than in the stomach and that little chitinolytic activity is present at pH higher than 6.5 in the pyloric caeca, resulting in low total digestibility.

Although animal ingredients had higher digestibility than plant ingredients, plant by-products that were pretreated, such as peeling and extrusion (beans and

chickpeas), they had the highest digestibility of the tested plant ingredients. We recommend a pre-treatment of plant ingredients to reduce anti-nutritional factors and increasing digestion. Diets with plant ingredients were not less digestible, except the reference diet.

We conclude that *in vitro* digestibility tests (acid and alkaline phases), using digestive enzymes for simulating the *in vivo* tilapia digestion process, was useful for pre-selecting ingredients and for testing diets containing animal and plant by-products, opening potential in tilapia aquaculture.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Manuel Salvador Trasviña Castro and Patricia Hinojosa Baltazar at CIBNOR for technical assistance. Ira Fogel at CIBNOR provided extensive editorial assistance. Funding was provided by CIBNOR (AC 0.24) and Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN 20141467; 20150267). M.M.M. is a recipient of a doctoral fellowship from CONACYT (grant 356758). H.R.G. is a fellow of COFAA and EDI of the Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCES

- Alarcón, F.J., F.J. Moyano and M. Díaz (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *J. Sci. Food Agric.* 82(7): 697-704.
- Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79–89.
- AOAC (2005) Official Methods of Analysis, 18th edn. AOAC International, Rockville, MD, USA.
- Casillas-Hernández, R., H. Nolasco-Soria, F. Lares-Villa, T. García-Galano, O. Carrillo-Farnes and F. Vega-Villasante (2006). Ritmo circadiano de la actividad enzimática digestiva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su efecto en el horario de alimentación. *Revista latinoamericana de recursos naturales* 2(2): 55-64.

- Castillo, G., M.A. Sanz, M.A. Serrano and A. Hernández (2002). Influence of protein source, type, and concentration, and product form on the protein quality of commercial enteral formulas. *J. Food Sci.* 67(1): 328–334.
- Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter and G.L. Catignani (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66(6): 1219–1227.
- Clements, K.D. and D. Raubenheimer, D (2005). Feeding and nutrition. In: Evans, D.H. and J.B. Claiborne (Eds.) *The physiology of fishes*, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, USA pp. 47–82.
- Córdoba-Murueta, J.H. and F.L. García Carreño (2002). Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210(1-4), 371–384.
- Danulat, E. and H. Kausch (1984). Chitinase activity in the digestive tract of the cod, *Gadus morhua* (L.). *J. Fish Biol.* 24(2): 125–133.
- Dimes, L.E. and N. Haard (1994). Estimation of protein digestibility – I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 108(2-3): 349–362.
- Ezquerro, J.M., F.L. García-Carreño and O. Carrillo (1998). *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 163(1-2): 123–136.
- El-Mowafi, A.F., H. Dorrell and D.P. Bureau (2000). Potential of a pH-stat method to estimate apparent digestibility of protein in salmonids. IX International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish, 21–25 May 2000, Miyazaki, Japan.
- Fernández-Gimenez, A.V., A.C. Díaz, S.M. Velurtas and J.L. Fenucci (2009). *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of formulated feeds for *Artemesia longinaris* (Crustacea, *Penaeidae*). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52(6): 1379–1386.
- Givens, D.I. and E.R. Deaville (1998). The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 50(7): 1131–1145.
- Goodno, C.C., H.E. Swaisgood and G.L. Catignani (1981). A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 115(1): 203-211.

- Grabner, M. and R. Hofer (1985). The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under *in vitro* conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 48(2): 111–122.
- Hamdan, M., F.J. Moyano and D. Schuhardt (2009). Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *J. Sci. Food Agr.* 89(7): 1195–1201.
- Haard, N. (1993). Digestibility and *in vitro* evaluation of plant protein for salmonid feed. In: Sessa, D.J. and C. Lim (Eds.) *Nutrition and utilization technology in aquaculture*. American Oil Chemists Society, Champaign, IL, USA pp. 1–29.
- Lazo, J.P. and D.A. Davis (2000). Ingredient and feed evaluation. In: Stickney, R.R. (Ed.) *Encyclopedia of aquaculture*. John Wiley and Sons, New York, pp. 453–463.
- Lee, P.G. and A.L. Lawrence (1997). Digestibility. In: D’Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D. M. (Eds.), *Crustacean Nutrition, Advances in world aquaculture*, vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 194–260.
- Lemos, D., A. Navarrete del Toro, J.H. Córdova-Murueta and F.L. Garcia-Carreño (2004). Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture* 239(1-4): 307–321.
- Lemos, D., A.L. Lawrence and A.J. Siccardi III (2009). Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 295(1-2): 89–98.
- Márquez, L., M. Overland, S. Martínez-Llorens, T. Morken and F.J. Moyano (2013). Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 384-387: 46–55.
- Nolasco, H. (2008). Métodos utilizados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para la medición de digestibilidad *in vitro* para camarón. In: *L. manual de metodologías de digestibilidad in vivo e in vitro para ingredientes y dietas para camarón* (Cruz-Súarez, E., H. Villarreal-Colmenares, M. Tapia-

- Salazar, M.G. Nieto-Lopez, D.A. Villarreal-Cavazos and D. Ricque-Marie (eds), pp. 215–225. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, Mexico.
- Nolasco-Soria, H. and F. Vega-Villasante (2000). Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. In: Civera-Cerecedo, R., C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie and L.E. Cruz-Suárez (eds.). Avances en nutrición acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, BCS, Mexico, pp. 149-165.
- Parada, J. and J.M. Aguilera (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* 72(2): 21–32.
- Pedersen, B. and B.O. Eggum (1983). Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 49(1-5): 265–277.
- Spinelli, J., L. Lehman and D. Wieg (1974). Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *J. Fish Board Can.* 31(6): 1025-1029.
- Tacon, A.G.J., M.R. Hasan and M. Metian (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. Rome, Italy, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 564, FAO, Rome, Italy.
- Tibbetts, S.M., J.A.J. Verreth, and S.P. Lall (2011). *In vitro* pH-stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture* 319(3-4): 407–416.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco and R. Civera (1995). The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Panaeus californiensis*-II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 112(1): 123-129.
- Wei, Q. and H. Zhimin (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. *Front. Chem. China* 3: 308–314.
- Wei, Q., H. Zhimin and S. Deqing (2003). Product distribution of casein tryptic hydrolysis based on HPSEC analysis and molecular mechanism. *Chem. Eng. Sci.* 58(3-6): 767-775.
- Yasumaru, F. and D. Lemos (2014). Species specific *in vitro* protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*), coxia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 426-427: 74-84.

Table 1. Formulation and proximate analysis of experimental diets (% dry matter).

Diet (g / 100 g)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Fish meal	31.8	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2
Wheat meal	35.0	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4
Soy paste	20.0	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9
Gelatin	4.0	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Fish oil	3.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Soy lecithin	3.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Vitamin and mineral mixture ²	2.2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Chromic oxide	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fish silage	--	30.0	--	--	--	--	--	--	--	--
Red crab meal	--	--	30.0	--	--	--	--	--	--	--
Bovine blood meal	--	--	--	30.0	--	--	--	--	--	--
Whey meal	--	--	--	--	30.0	--	--	--	--	--
Extruded chickpea meal	--	--	--	--	--	30.0	--	--	--	--
Chickpea meal	--	--	--	--	--	--	30.0	--	--	--
Extruded bean meal	--	--	--	--	--	--	--	30.0	--	--
Copra meal	--	--	--	--	--	--	--	--	30.0	--
<i>Jatropha curcas</i> meal	--	--	--	--	--	--	--	--	--	30.0
Totals	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Proximate analysis (% dry matter basis)

					10.08±0.0		11.23±0.1			
Moisture	5.37±0.68	7.63±0.11	8.04±0.11	9.42±0.38	7	9.59±0.02	6	9.92±0.01	8.68±0.13	5.51±1.62
	44.29±4.8	42.79±2.6	38.28±2.1	53.84±0.6	53.90±0.7	38.05±1.4		37.53±0.1	37.92±2.0	38.08±1.8
Crude protein	5	2	4	2	7	0	38.4±0.34	1	4	6
		14.49±0.1	10.09±0.6			13.17±0.1				21.87±1.4
Crude fat	9.70±0.11	2	5	7.16±0.16	6.44±0.10	9	7.90±0.01	6.80±0.10	9.30±0.02	0
		10.15±0.0	14.45±0.0							
Ash	5.44±1.48	3	2	6.64±0.05	6.14±0.04	6.64±0.02	6.35±0.03	4.17±0.05	8.43±0.06	7.10±0.01
Crude fiber	0.91±0.04	0.49±0.02	2.83±0.06	0.25±0.02	0.56±0.02	1.12±0.07	0.99±0.01	0.75±0.01	2.80±0.07	1.26±0.17
NFE	39.76	32.13	34.36	32.17	32.97	41.04	46.45	50.76	41.57	31.73

NFE = nitrogen-free
extract

¹Diets: (1) Reference diet; (2) 30% fish silage meal; (3) 30% red crab meal; (4) 30% bovine blood meal; (5) 30% whey meal; (6) 30% extruded chickpea meal; (7) 30% chickpea meal; (8) 30% extruded bean meal; (9) 30% coconut meal; and (10) 30% *Jatropha* paste.

²Vitamin and mineral mixture (g / kg food): thiamine, 0.011; folic acid, 0.005; riboflavin, 0.02; pyridoxin, 0.011; choline, 0.275; pantothenic acid, 0.0035; niacin, 0.088; vitamin B12, 0.00001; vitamin K, 0.0044; vitamin D3, 0.000055; vitamin E, 0.04422; ascorbic acid, 0.375; calcium, 3.0; phosphorus, 7.0; magnesium, 0.5; iodine, 0.001; iron, 0.15; copper, 0.003; zinc, 0.20; manganese, 0.013; selenium, 0.0004.

Table 2. Proximate analysis of experimental ingredients

Ingredients (%)	FS	RC	BB	WH	EC	CH	EB	CM	JP
Moisture	8.19±0.11	2.09±0.03	6.92±0.04	8.21±0.06	9.58±0.08	7.70±0.01	10.85±0.17	7.87±0.99	5.43±0.02
Crude protein	42.86±0.37	43.16±3.02	83.50±0.93	80.66±0.73	21.39±0.02	19.68±0.62	24.43±0.57	20.93±0.68	40.91±0.34
Lipid	28.73±0.61	1.09±0.15	0.69±0.02	1.53±0.06	6.45±1.06	7.34±0.14	0.52±0.05	1.94±0.16	32.12±0.15
Ash	16.93±1.60	32.64±0.09	3.96±0.02	2.32±0.00	3.25±0.02	3.96±0.08	3.48±0.02	9.80±0.20	6.60±0.05
Crude fiber	0.20±0.03	11.42±0.51	0.62±0.05	0.42±0.01	1.67±0.01	2.25±0.06	1.03±0.15	6.99±0.28	3.36±0.67
NFE	11.27	11.70	11.24	15.09	67.21	66.79	70.54	60.28	17.03
NFE nitrogen free extract									

Ingredients: (FS) fish silage; (RC) red crab; (BB) bovine blood; (WH) whey; (EC) extruded chickpea; (CH) chickpea; (EB) extruded bean; (CM) coconut meal; and (JM) *Jatropha curcas* paste.

Table 3. Equivalent values of leucine in *in vitro* digestion. Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

Released leucine (μM / g ingredient)						
Diet ¹	Accumulated			By digestion phase		
	T = 0	after acid	after alkaline	acid	alkaline	total
RD	157.1±2.2 ^{bc}	200.2±2.1 ^{bc}	236.0±7.2 ^{cde}	43.1±2.1 ^{cd}	35.8±7.2 ^{cd}	79.0±7.2 ^d
FS	193.2±12.8 ^a	251.5±2.2 ^a	314.4±1.9 ^b	58.3±2.2 ^{ab}	62.9±1.9 ^{bc}	121.2±1.9 ^{bc}
RC	148.8±1.4 ^{bcd}	191.8±2.7 ^c	263.4±5.2 ^c	43.0±2.7 ^{cd}	71.6±5.2 ^b	114.6±5.2 ^c
BB	173.9±2.4 ^{ab}	212.4±4.8 ^b	326.2±13.9 ^b	38.5±4.8 ^{cd}	113.8±13.9 ^a	152.3±13.9 ^{ab}
WH	192.7±1.5 ^a	262.6±2.3 ^a	373.2±3.4 ^a	69.9±2.3 ^a	110.6±3.4 ^a	180.5±3.4 ^a
EC	127.9±1.6 ^{cd}	170.9±2.8 ^d	209.9±3.5 ^f	43.0±2.8 ^{cd}	39.0±3.5 ^{cd}	82.0±3.5 ^d
CH	145.9±3.3 ^{bcd}	175.1±4.2 ^d	214.6±2.2 ^f	29.2±4.2 ^d	39.5±2.2 ^{cd}	68.7±2.2 ^d
EB	133.2±1.9 ^{cd}	197.4±2.9 ^c	223.4±4.9 ^{de}	64.1±2.9 ^{ab}	26.0±4.9 ^d	90.1±4.9 ^{cd}
CM	121.9±2.7 ^d	174.1±3.1 ^d	223.9±1.4 ^{de}	52.3±3.1 ^{bc}	49.8±1.4 ^{bcd}	102.1±1.4 ^{cd}
JM	133.2±5.1 ^{cd}	177.1±2.0 ^d	251.2±5.1 ^{cd}	43.9±2.0 ^{cd}	74.0±5.1 ^b	117.9±5.1 ^c
Ingredient ²						
RI	361.0±4.8 ^a	420.7±2.8 ^a	663.4±11.8 ^b	59.6±2.8 ^{cd}	242.7±11.8 ^c	302.3±11.8 ^{bc}
FS	255.1±1.8 ^d	330.6±4.2 ^c	494.8±9.1 ^c	75.5±4.2 ^{bc}	164.3±9.1 ^d	239.7±9.1 ^{bc}
RC	102.5±1.3 ^e	180.6±4.5 ^d	194.3±0.0 ^{de}	78.0±4.5 ^b	13.7±0.0 ^e	91.8±0.0 ^{cd}
BB	271.3±3.2 ^c	323.0±2.8 ^c	912.7±35.6 ^a	51.8±2.8 ^{de}	589.6±35.6 ^a	641.4±35.6 ^a
WH	295.1±3.5 ^b	397.0±10.4 ^b	889.4±25.1 ^a	101.9±10.4 ^a	492.4±25.1 ^b	594.3±25.1 ^a

EC	97.8±4.6 ^e	126.3±2.2 ^f	159.8±2.3 ^e	28.5±2.2 ^{fg}	33.5±2.3 ^e	62.0±2.3 ^d
CH	99.8±1.5 ^e	117.1±0.6 ^f	133.6±1.9 ^e	17.2±0.6 ^g	16.5±1.9 ^e	33.7±1.9 ^d
EB	83.3±2.0 ^f	120.4±1.5 ^f	140.0±3.1 ^e	37.1±1.5 ^{ef}	19.6±3.1 ^e	56.8±3.1 ^d
CM	26.8±0.3 ^g	54.1±0.7 ^g	111.0±2.6 ^e	27.3±0.7 ^{fg}	56.9±2.6 ^e	84.2±2.6 ^d
JM	106.4±1.1 ^e	155.4±1.8 ^e	277.1±4.2 ^d	49.0±1.8 ^{de}	121.6±4.2 ^d	170.6±4.2 ^c

¹Diets: (30% of ingredients were used in all diets): (RD) Reference; (FS) fish silage meal; (RC) red crab meal; (BB) bovine blood meal; (WH) whey meal; (EC) extruded chickpea meal; (CH) chickpea meal; (EB) extruded bean meal; (CM) coconut paste; and (JM) *J. curcas* meal.

²Ingredients: (RI) Reference (fish meal); (FS) fish silage meal; (RC) red crab meal; (BB) bovine blood meal; (WH) whey meal; (EC) extruded chickpea meal; (CH) chickpea meal; (EB) extruded bean meal; (CM) coconut paste; and (JM) *Jatropha curcas* meal.

Figures legends

Fig. 1. *In vitro* digestibility of diets including animal ingredients in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Diets (30% of ingredients were used in all diets): (RD) reference; (FS) fish silage meal; (RC) red crab meal; (BB) bovine blood meal; (WH) whey meal.

Fig. 2. *In vitro* digestibility of diets including plant ingredients in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Diets (30% of ingredients were used in all diets): (RD) reference; (EC) extruded chickpea meal; (CH) chickpea meal; (EB) extruded bean meal; (CM) coconut paste; and (JM) *Jatropha curcas* meal.

Fig. 3. *In vitro* digestibility of animal ingredients in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ingredients: (RI) reference (fish meal); (FS) fish silage meal; (RC) red crab meal; (BB) bovine blood meal; (WH) whey meal.

Fig. 4. *In vitro* digestibility of plant ingredients in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ingredients: (RI) reference (fish meal); (EC) extruded chickpea meal; (CH) chickpea meal; (EB) extruded bean meal; (CM) coconut paste; and (JM) *Jatropha curcas* meal.

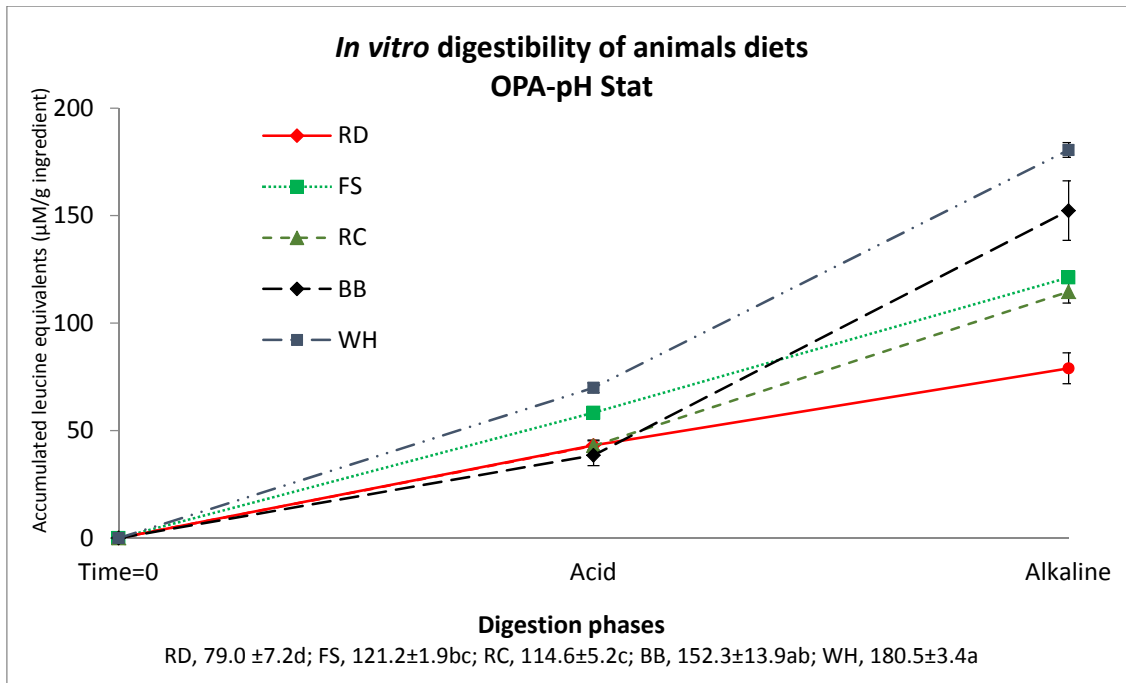


Fig. 1.

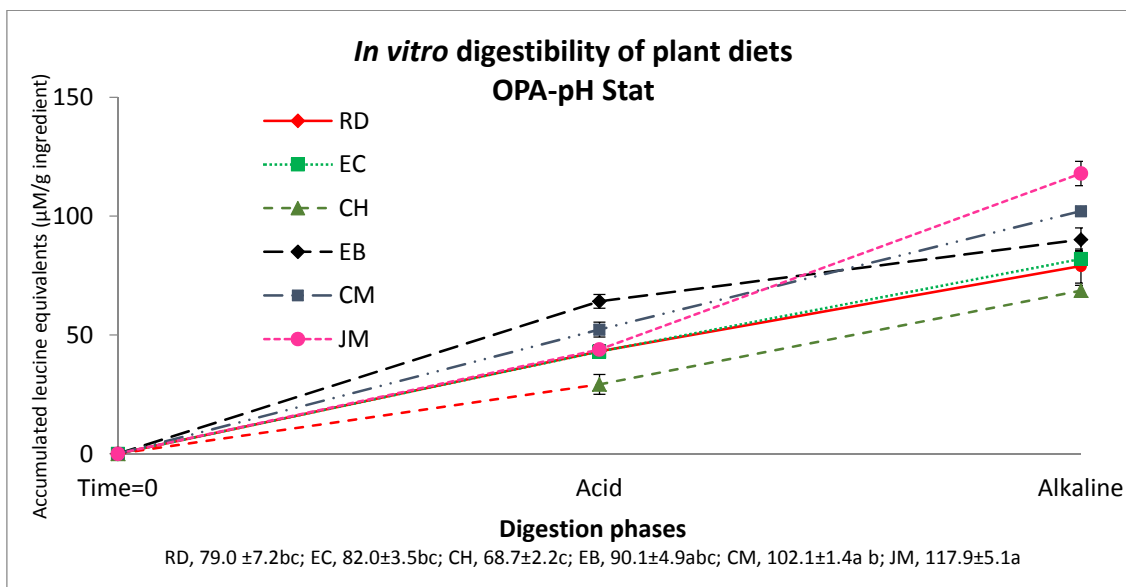


Fig. 2.

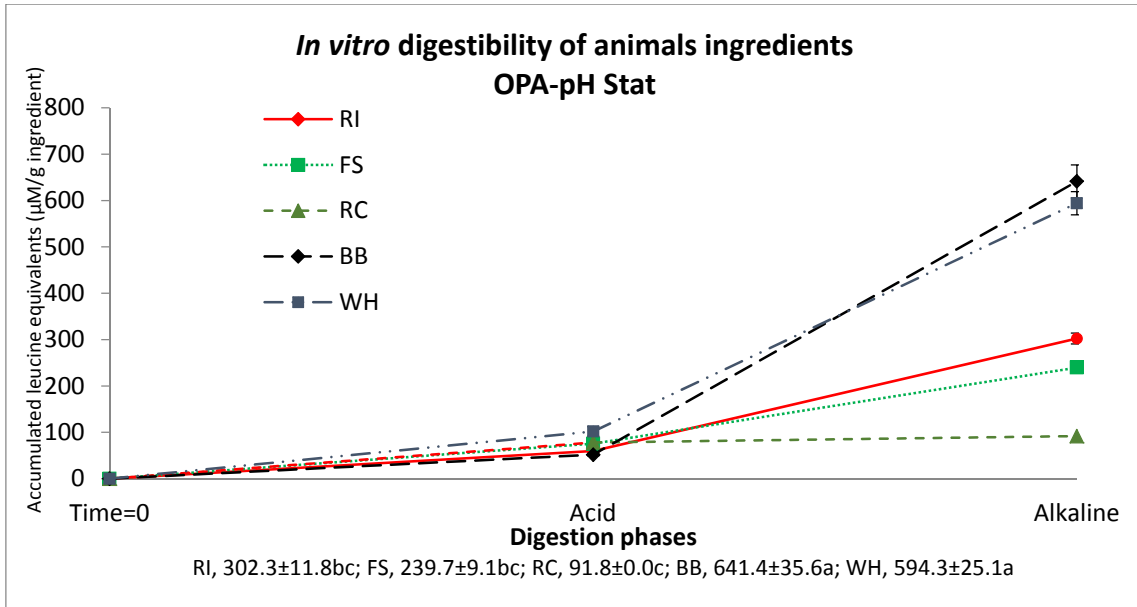


Fig. 3.

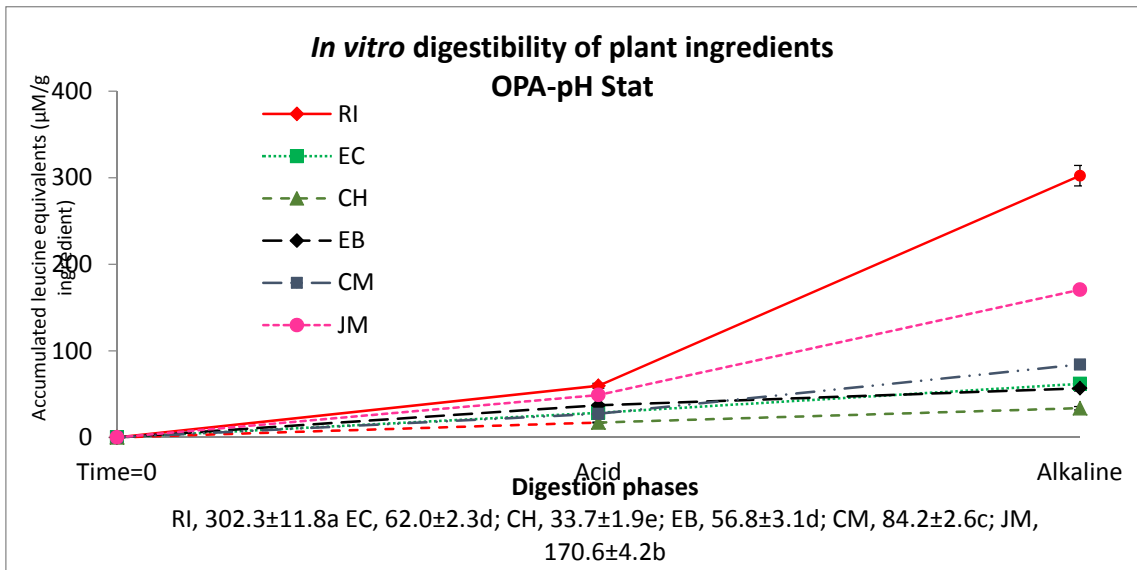


Fig. 4.

ANEXO C. Artículo científico generado del experimento III y IV

Digestibility, growth, blood chemistry and enzyme activity of juvenile *Oreochromis niloticus* fed isocaloric diets containing animal and plant by-products

Abstract

In this work, we studied the digestibility, growth, blood chemistry and enzyme activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles (0.95 ± 0.18 g) using different animal (fish silage meal FS, dairy whey meal WH, bovine blood meal BB and red crab meal RC) and plant (extruded bean EB, extruded chickpea meal EC, coconut meal CM, *Jatropha curcas* meal JM and chickpea meal CH) dietary by-products. Nine isocaloric diets (306 ± 9.1 Kcal g^{-1}) were evaluated during 60 d. The higher digestibility of crude protein values for animal and plant sources were obtained for the WH (93.6) and EB (90.5) diets, respectively. The final body weight was higher ($P < 0.05$) for the RC and EC diets, meanwhile the FS and RC by-products obtained the higher protein efficiency ratio. Hematocrit was similar ($P < 0.05$) among the diets of each by-product source and presented correlation with growth parameters. The highest glucose, cholesterol and triglyceride values were obtained for FS (138.0, 260.5 and 389.0 mg dL^{-1} , respectively) and WH (174.5, 242.3 and 284.0 mg dL^{-1} , respectively) groups. A positive correlation was found between the digestibility of crude protein of ingredients and chymotrypsin activity ($r = 0.574$; $P = 0.003$). *O. niloticus* was able to better utilize FS, WH, EB and EC by-products adjusting its digestive physiology. Such ingredients can be used for formulating cheaper and efficient tilapia diets.

Key words: alternative by-products, digestive response, formulated diets, growth performance, Nile tilapia, physiology.

Introduction

Nutritional studies on tilapia aquaculture are still needed to reduce the high costs generated by feeding and to optimize food utilization for achieving the better growth performance of fish. For the latter, parameters such as weight gain, growth and survival (García-Ulloa *et al.*, 2013) among others, are commonly related to food source, content, biochemical composition of ingredients and diets (Job *et al.*, 2015), and dietary energy balance, which are utilized as evaluation tools to properly interpret fish performance by a given diet or ingredient. There are other valuable biological tracers that are used to explain the growth responses of tilapia. It is possible to argue that most of the reports include partial information since only few indicators are applied when evaluating nutritional items for tilapia.

Variations in the quality and quantity of dietary nutrients influence digestibility, growth performance, body biochemical composition, hematocrit and enzyme activity in fish (Lundstedt *et al.*, 2004). Thus, the acquisition, digestion and assimilation of food on growth and survival of tilapia, involve digestive processes in which many components play a very important role. For instance, the configuration of the intestine provides an advantage to Nile tilapia in digestion and absorption of nutrients when a less energy-efficient herbivorous diet is used (Tengjaroenkul *et al.*, 2000), in which enzymes, chemicals and proximal components directly affect its growth responses. This way, the dietary inclusion of ingredients validated by the interaction of several digestive indexes may offer physiological advantage in knowing the nutritional requirements and biological responses of tilapia.

The use of alternative feedstuff from animal and plant by-products should improve digestibility and assimilation of tilapia diets. While the predominant concern about the effects of various alternative plant or animal proteins is mainly dealing on tilapia growth and feed efficiency. The study of physiological and growth parameters to evaluate feed efficiency of alternative dietary ingredients represents a basis to develop feed formulation suitable for tilapia, so that cost-effectiveness can be obtained. Therefore, the objective of this study was to investigate the digestive physiology, blood chemistry and growth responses of *O. niloticus* juveniles fed on isocaloric diets containing different animal and vegetable by-products.

Materials and Methods

Feed ingredients

The ingredients were milled (Grindmaster™, Model 505, Louisville, KY, USA) and sieved (250 µm; No. 60, FIIC, S.A. de C.V., México) to be added in the diets preparation.

Fish silage (FS) was prepared from tilapia (*O. niloticus*) by-products. Tissues were minced (Torrey®, M-22RW), placed in plastic bags and frozen (-20°C) until use. FS was prepared in 5-L plastic containers adding 1 kg of fish by-product and 15 mL of formic acid to obtain a final pH of 3.8-4. Following Fagbenro and Jauncey (1993), FS was incubated at 29 ± 1°C under anaerobic conditions for 7 d and dried in a draft oven at 60°C for 24 h. Whey (WH) meal was obtained from fresh whey cow milk by boiling treatment (15 min). Centrifugation was used to remove fat and lactic acid was added to allow protein precipitation, which was recovered using cold filtration with a cotton blanket. Paste was finally dried at 60°C for 72 h. Bovine blood (BB) meal was

prepared using blood from the municipal slaughterhouse of Tangancícuaro, Michoacán. Blood was sun-dried during five d and covered with a plastic mesh. Red crab (RC) meal was obtained from fresh red crab (*Pleuronectes planipes*), and processed at the industrial plant Pesquera Matancitas, B.C.S., Mexico.

Extruded bean (EB) meal was prepared from complete beans (*Phaseolus vulgaris*) that were soaked for 1 h to remove the cuticle and humidified during 24 h at 26% before extrusion. Chickpea (*Cicer arietinum*) was used either complete (CH) or extruded (EC), the latest was prepared by 24 h extrusion of humidified meal (26% humidity) (20DN extruder, CW Brabender® Instruments, Inc, NJ, USA). *Jatropha curcas* meal (JM) was obtained using a mechanical press (Grima-Biodiesel™, DF, Mexico) for seed broking (Hydraulic press Komet® DD85) and dehulling. A proportion of 1.5/10 p/v of hexane was mixed with the meal for oil extraction, then the meal was filtered, sun-dried and stored at 4°C. Coconut meal (CM) was prepared with coconut fruit given by Copreros Unidos por Tabasco S. de P.R. de R.L., Mexico, then grounded at 200 µm.

Diet preparation

A reference diet (RD) was formulated with 316.09 kcal g⁻¹ to meet or exceed the nutrient requirements for Nile tilapia (NRC, 1993). Nine isocaloric (321.92 ± 9.10 kcal g⁻¹; Shiao and Huang 1990) diets (FS, WH, BB, RC, EB, EC, CM, JM and CH) were prepared containing 85% of RD and 15% of the tested ingredient. All diets were extruded (C.W. Brabender® Instruments, Inc.) and dried at 45°C to reduce humidity below 10%. For the digestibility assays (Cho and Slinger, 1979), 30% of each tested ingredient was included in the RD and chromic oxide (1%) was used as inert marker (Cruz-Suárez *et al.*, 2009).

Proximate chemical composition of ingredients and diets was analyzed according to AOAC (1995) protocol. Chemical content of ingredients and diets formulation are shown in Tables 1 and 2, respectively.

***In vivo* digestibility**

In vivo digestibility assays with the experimental diets were previously practiced. Fifty 50-L plastic tanks covered with plastic mesh were used for the *in vivo* digestibility test. Water temperature and dissolved oxygen were maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $> 4 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. Photoperiod was adjusted at 14 h light: 10 h darkness. Five fish ($51.1 \pm 11.6 \text{ g}$) per diet were used to evaluate *in vivo* digestibility. Experimental diets were offered during seven d before starting the assays, thereafter, fish were daily fed to apparent satiation at 08:00 and 16:00 h. Feces were collected from each tank three hours after feeding using a siphon (Jones and De Silva, 1997), then washed, lyophilized and stored at -70°C .

Analysis of protein and chromic oxide content in feces were performed according to AOAC (1995), and Furukawa and Tsukahara (1966), respectively. The apparent digestibility coefficient for dry matter (ADC_{DM}) and protein (ADC_{CP}) were calculated according to the equations described by Maynard *et al.* (1981). Dry matter (ADC_{IDM}) and protein (ADC_{ICP}) digestibility of ingredients were determined according to Cho and Slinger (1979).

Growth trial

The growth trial was conducted in 180-L rectangular plastic tanks (80 x 58 x 58 cm) for 60 d. Five juveniles ($0.98 \pm 0.3 \text{ g}$) per tank were stocked at $18.6 \text{ juvenile m}^{-3}$ using four replicates per treatment. Daily fish were fed at 10% of total biomass divided in three rations (10:00, 14:00 and 18:00 h) and feed ration was gradually reduced to 4%

of total biomass at the end of the trial. The experimental tanks were cleaned every week and 50% water was renewed. Water temperature ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) and dissolved oxygen ($\geq 4 \text{ mg L}^{-1}$) were monitored on a daily basis.

Body weight (BW) and total length (TL) of tilapia were measured each ten days using a $\pm 0.01 \text{ g}$ precision digital balance (Ohaus®, Parsippany, NJ, USA) and a vernier caliper (0.00 mm), respectively. The specific growth rate (SGR) was calculated using: $\text{SGR} = [(\ln(\text{final weight}) - \ln(\text{initial weight})) / \text{cultivation days}]$. After 60 d, the totality of surviving organisms from each replicate tank was used for calculation of feed efficiency, somatic indexes, blood and digestive enzymes analyzes, and for determination of body chemical composition.

Feed utilization and somatic indexes

Feed utilization was calculated using standard formulas: Weight gain (WG) = (final weight – initial weight), feed conversion ratio (FCR) = [feed consumption (g on dry weight basis)/body weight gain (g, wet weight basis)], feed efficiency ratio (FER) = [WG / feed consumption (g on dry weight basis)] $\times 100$, and protein efficiency ratio (PER) = [net weight gain (g, wet weight basis)/protein fed (g, dry matter basis)].

Four fish per diet were analyzed to determine the hepatosomatic (HSI) and intestinal somatic indexes (ISI) using the following formulas:

$$\text{HSI (\%)} = [\text{wet weight of liver (g)}/\text{wet weight to fish (g)}] \times 100;$$

$$\text{ISI (\%)} = [\text{wet weight of intestine (g)}/\text{wet weight to fish (g)}] \times 100.$$

Blood parameters

Tilapia blood was collected from the caudal venous ($n = 4$ per diet) after 12 hours of starving utilizing a 3-mL syringe and BD vacutainer® tubes with heparin as anticoagulant. Hematocrit (HEM) was determined according to Goldenfarb *et al.*

(1971). Glucose (GLU), total cholesterol (TCH), and triglycerides (TG) were determined in agreement with Henry *et al.* (1974), Ellefson and Caraway (1976) and McGowan *et al.* (1983), respectively.

Digestive enzymes

Tilapia (n = 4 per diet) was starved for 24 hours and sacrificed to obtain enzyme extracts from the intestine. Every tissue was homogenized (Potter PRO 250[®]) in three mL of cold distilled water (4°C) per g of tissue (1:3 w/v). All samples were kept in ice during the process to avoid enzyme denaturation and /or damage. The homogenate was centrifuged (Eppendorf[®] 5810R) twice for 10 min at $15\,294 \times g$ and 4°C to remove the insoluble tissue material. The floating lipid fraction was removed and the aqueous supernatant was recovered and kept at -20°C until use. This fraction was considered a crude extract (Vega-Villasante *et al.*, 1999). Thereafter, the supernatant was taken as enzyme crude extract (CE) and kept at -20°C until enzyme analysis.

Alkaline proteases activity of the samples was determined according to García-Carreño (1992), using azocasein (2.0% Tris-HCl 100 mM, pH 9) as substrate. For controls, the crude extract was applied after stopping the reaction with the TCA reagent. One unit of alkaline protease activity was defined as the amount of enzyme required to increase 0.01 unit Abs min⁻¹. Trypsin activity was determined following the method described by Erlanger *et al.* (1961) with slight modifications using N- α -Benzoyl-DL-arginine hydrochloride 4-nitroanilide (BAPNA) as substrate. For controls, the crude extract was inactivated (treated in water bath at 95°C for 5 min). The absorbance (405 nm) was measured every 15 s for 30 min. One unit of trypsin activity was defined as the enzyme required to release 1 μ Mol of p-nitroaniline per min. Chymotrypsin activity of the samples was determined according to DeIMar *et al.*

(1979), with slight modifications as described for the trypsin method previously, using N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (SAAPNA) as a substrate and Tris-HCl 60 mM pH 8 and CaCl₂ pH 8. For control, the crude extract was inactivated (treated in water bath at 95°C, 5 min). One unit of chymotrypsin activity was defined as the enzyme required to release 1 μMol of 4-nitroanilide per minute.

Amylase activity was determined according to Vega-Villasante *et al.* (1993), using starch solution (1% Tris HCl, 100 mM, pH 8) as substrate. For controls, the extract crude was applied after adding DNS reagent. One unit of amylase activity was defined as the enzyme required for release of 1 μMol of glucose per minute.

Lipase activity was determined according to Versaw *et al.* (1989), with β-naphthyl caprylate as substrate (100 mM in DMSO). One unit of lipases activity was defined as the enzyme required to release 1 μMol of β-naftol per minute. The activity of proteases, amylases and lipases are expressed as the number of units of enzyme per organism (total units, UT).

Body proximate composition

The totality of surviving fish was analyzed for body composition on a wet weight basis. Crude protein was determined using the Kjeldahl method, crude fiber was determined by sequential extraction of a defatted sample with 1.25% H₂SO₄ and 1.25% NaOH, and ash was determined with a muffle furnace (AOAC, 1995), and lipids content were extracted with anhydrous ether in an extraction system (Soxtec Avanti 2050, Foss Tecator[®], Copenhagen, Denmark; Bligh and Dyer, 1959).

Statistical analysis

Data were separately analyzed for diets containing animal or plant by-products. Normality and homoscedasticity were analyzed using the Lilliefors's and Bartlett's tests

(Sokal and Rohlf, 1995). One-way ANOVA and Tukey's multiple range tests were used to detect differences in mean values among tested diets and ingredients. Regression analyzes were performed between digestive parameters and growth responses (Software Statistica 7.0, Statsoft, Tulsa, OK). Significance was set at $P < 0.05$ for all analyzes.

Results

The mean values of ADC for dry matter and ingredients showed significant differences ($P < 0.05$) among each by-products group (Table 3).

In diets containing animal by-products, the higher mean values for ADC_{DM} and ADC_{CP} ($P < 0.05$) were obtained for RD (83.7 and 93.0, resp.) being similar to those observed for FS (78.9 and 92.2, resp.) and WH (78.8 and 93.6, resp.). Likewise, FS and WH were the most digested ingredients for ADC_{IDM} (79.7 and 80.4, resp.) and ADC_{ICP} (82.6 and 89.3, resp.). For the plant by-products diets, the higher ADC_{DM} and ADC_{CP} values were also showed by the RD group ($P < 0.05$), being comparable with the EB (78.9 and 90.5, resp.) diet. ADC_{IDM} and ADC_{ICP} coefficients for plant by-products were different ($P < 0.05$) fluctuating from 67.8 found for EB, to 84.4 obtained for the CM diet.

Growth parameters, feed efficiency and somatic indexes are shown in Table 4. There were significant differences ($P < 0.05$) in the mean FBW of fish fed on diets containing both by-products. The highest FBW were obtained for the RC (23.30 g) and EC (23.60 g) groups. PER for the animal by-products fluctuated from 1.9 for FS and RC groups, to 1.5 found for the BB treatment ($P < 0.05$). The rest of growth parameters were similar among each by-product group.

There were not significant differences ($P<0.05$) in mean values of HEM among all the diets, while GLU, TCH and TG varied significantly (Table 5). For the animal by-product diets, concentrations of GLU and TG in blood were significantly higher for the FS (138.0 and 389.0 mg dL⁻¹, resp.) and WH (174.5 and 284.0 mg dL⁻¹, resp.) diets. For the plant by-products, GLU concentration was significantly higher when using the JM diet (130.3 mg dL⁻¹). The CM diet resulted in significantly highest TCH concentration (254.0 mg dL⁻¹) compared to the CH diet (182.0 mg dL⁻¹). The CM diet also registered the highest TG concentration (304.0 mg dL⁻¹).

There were significant differences ($P<0.05$) in enzyme activity among all the diets (Table 5). For the animal by-products, the FS group presented the highest enzyme activity (protease = 171.3 UT, trypsin = 20806.6 UT, chymotrypsin = 128509.7 UT, amylase = 116.5 UT and lipase = 19.0 UT). In the case of the plant by-product diets (Table 5), the CM group displayed the highest values for trypsin (16381.3 UT) and lipase (32.0 UT), and EB for protease, chymotrypsin and amylase (146.5, 144202.8 and 131.0 UT, resp.).

Proximal composition of whole-body fish is presented in Table 6. Crude protein was similar (58.46 ± 0.59 g kg⁻¹) ($P<0.05$), but lipids and carbohydrates presented significance ($P<0.05$) among the tested diets. The mean overall concentration of lipids (20.31 g kg⁻¹) found for the experimental groups was higher than that for RD (15.5 g kg⁻¹).

A positive correlation was found between the ADC_{ICP} and chymotrypsin activity ($r = 0.57$; $P=0.003$). The activity of chymotrypsin increased when the PER was higher. The HEM presented correlations with FBW ($r=0.49$; $P=0.013$), TL ($r=0.58$; $P=0.003$),

WG ($r=0.49$; $P=0.013$), FCR ($r=0.59$; $P=0.002$), FER ($r=0.59$; $P=0.002$), and PER ($r=0.51$; $P=0.009$; Table 7).

Discussion

In tilapia, the combination of intestinal length together with the wide distribution of enzymes (proteases, amylases, lipases, etc.) along the digestive tube enhance the possibility to digest different dietary sources breaking down the nutrients in small particles that flow into the blood stream for building up tissues and improving overall growth responses.

In this study, the diet using FS showed the highest enzyme activity and ADC values, which coincide with the highest concentrations of glucose, cholesterol and triglycerides in blood, suggesting a strong transportation of these elements into the blood stream. This can be partially explained by the chemical process (hydrolysis) of FS meal that produced small particles easily assimilated by tilapia, such as peptides and amino acids (Arason, 1994). According to Pérez (1995), the nutritional value of silage meals is not affected by the chemical process, resulting in suitable protein sources for substituting expensive traditional feedstuffs.

In fact, the most intense enzymatic activity was also observed for the FS diet among the animal by-product groups. Feeding, digestibility and growth studies on warm water species, including the indian carp *Cirrhinus mrigala* (Ali *et al.*, 1994), tilapia *O. niloticus* (Fagbenro and Jauncey, 1993; Fagbenro, 1998) and *O.aureus* (Goddard and Al-Yahyai, 2001; Goddard *et al.*, 2003), and pacu *Piaractus mesopotamicus* (Vidoiti *et al.*, 2002), have demonstrated that FS is highly digestible and effective for substituting fish meal up to 75%.

In our study, the diet containing WH meal yielded high digestibility compared to that obtained with FS and RD diets. WH meal contains a rich and heterogeneous protein mixture (Swaisgood, 1996) that could increase its high digestibility. Toullec *et al.* (1974) obtained high digestibility (90%) for WH meal in the intestine of small ruminant. So far, our study is the first report on the use of WH in fish diets.

Halver and Hardy (2002) pointed out that an essential amino acid deficiency in the diet of aquatic organisms negatively affects protein utilization, reducing fish growth and food efficiency. El-Sayed (1998) reported low growth of Nile tilapia (150 d-old) when totally substituting fish meal with BB meal. In this study, BB meal resulted in the highest crude protein content, but in the lowest ADCs for dry matter and ingredients. This could partially be a consequence of unbalances in nutritional content, such as deficiency of isoleucine and methionine in BB meal (NRC, 1983; Tacon and Jackson, 1985). This would also contribute to explain the lowest PER value obtained with the BB diet when compared to the rest of the diets containing animal by-products. It is worth noting that, according to Davies *et al.* (1989), nutrient digestibility and absorption of BB meal can be increased adding the needed essential amino acid.

Although RC meal has been successfully tested in crustacean diets (Casillas and Magallón, 1988; Villarreal *et al.*, 2006) it showed to be poorly digested by tilapia. The high content of ash found in the RC meal is mainly attributed as a consequence of the high mineral content in chitin (Jung *et al.*, 2006). Chitin is a complex carbohydrate that forms the structural part of the exoskeleton of crustaceans, and constitutes 15-30% of their total weight (Garzón *et al.*, 1993); most probably contributing to the low ADCs for dry matter and ingredients obtained in our study,

which coincides with the observations of Shiau and Yu (1999), who reported low ADC_{DM} by tilapia when using diets with high chitin content. Yet, despite the low digestibility coefficients observed for the RC diet, the protein efficiency ratio of tilapia obtained when using this diet was high and similar to those obtained with the FS and WH diets (Table 4). This may be a consequence of the presence of insulin-like growth promotor in RC meal (Vega-Villasante *et al.*, 2002). It is worth noting, however, that currently there is no commercial fishery of the RC, constituting a limitation for its use in aquaculture diets.

Although tilapia are herbivorous fish that possess morphological and physiological adaptations for the utilization of diets from vegetable sources, plants contain a variety of nature substances such as anti-nutrients, that interfere with the use of the nutrients (Valdez-González *et al.*, 2013). The thermic process for extrusion can reduce anti-nutrients from plants diets. The tested extruded diets (EB and EC) obtained the highest ADCs values. According Frias *et al.* (2000), extrusion reduces anti-nutritional factors and decreases trypsin inhibitors increasing diet digestibility. On the contrary, the CH, JM and CM diets resulted with low ADCs values reinforcing the presence of possible anti-nutrients such as phytic acid (Nestares *et al.*, 1999; Cheryan, 1980; Selle *et al.*, 2000; Vielma *et al.*, 2000), phenolic compounds (Hahn *et al.*, 1984) and trypsin inhibitors (Birk, 1989). The presence of phytic acid in feedstuff forms chemical complexes that alter the protein structure, diminishing its solubility, digestibility and enzymatic activity (Spinelli *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1985; Hossain and Jauncey 1993; Vielma *et al.*, 2000), which could explain our results. The JM diet showed the lowest trypsin activity and ADCs values reflected in the low TG content in blood. Besides, the phytic acid produces abnormalities in the intestinal

epithelium which reduce nutrient and energy availability, and consequently, depress fish growth performance. Makkar and Becker (2009) and Kumar *et al.* (2011) reported low ADCs values of *J. curcas* in tilapia *O. niloticus*. The low ADC_{DM} values obtained for the CM diet are related to its high fiber content. Jackson *et al.* (1982) concluded that the dietary inclusion of CM in formulated diets with 30% CP for *O. mossambicus* during 7-9 weeks, can efficiently substitute fish meal without affecting fish growth. However, Thorne *et al.* (1990) concluded that CM is deficient in lysine.

Despite the differences found in the biochemical composition of diets, tilapia growth performance, nutrient utilization, biological indexes, blood parameters, digestive enzymatic activity and proximal composition of fish body were similar among the animal and plant by-products groups, indicating that the dietary energy content could strongly influence the overall growth responses. The overall response of tilapia to dietary energy was in agreement with its energy requirement (NRC, 1993). It seems that non-protein energy in diets was spared to dietary protein from energy metabolism and then increased its utilization for fish growth (Li *et al.*, 2012). Significant correlations found between the ACD_{ICP} and chymotrypsin activity, and between hematocrit with final weight, FCR and PER, suggest that this enzyme and the blood cells content could be used to evaluate the digestive physiology of tilapia.

Conclusions

The processed and extruded by-products (FS, WH, EB and EC diets) presents the best ADCs values for protein and dry matter. Such values can be used for formulating cheaper and efficient tilapia diets. Finally, *O. niloticus* was able to utilize different animal and plant by-products by adjusting of its digestive physiology.

References

- Ali, M. Z.; Gheyasuddin, S.; Zaher, S.; Hossain, M. A. and Islam, M. N. 1994. Evaluation of fish silage from underutilised marine fishes as protein sources in the diet of major carp (*Cirrhinus mrigala*). *Journal of Aquaculture in The Tropics* 8:247-254.
- Arason, S. 1994. Production of fish silage. In: *Fisheries Processing: Biotechnological applications*. Ed. A.M. Martin. Pp. 244-272. Chapman and Hall, London.
- Birk, Y. 1989. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. In J Huisman, AFB Van der Poel, IE Liener (Eds.), *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds* (pp. 83–94). The Netherlands: Pudoc: Wageningen.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
- Casillas, H. R. and Magallón, B. F. 1988. Substitución de insumos tradicionales en las dietas para la engorda del camarón. Informe Interno. Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., México.
- Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13:297–335.
- Cho, C. Y. and Slinger, S. J. 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: JE Halver and K Tiews (eds.). *Finfish nutrition and fishfeed technology* vol. 2. Heenemann, Berlin, pp. 239–247.
- Cruz-Suárez, L. E.; Tapia-Salazar, M.; Villarreal-Cavazos, D.; Beltran-Rocha, J.; Nieto-López, M. G.; Lemme, A. and Ricque-Marie, D. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 292:87–94.
- Davies, S. J.; Williamson, J.; Robinson, M. and Bateson, R. I. 1989. Practical inclusion levels of common animal by-products in complete diets for tilapia

- Oreochromis mossambicus*, Peters. In: Proc. 3rd Intl. Symp. On Feeding and Nutr. Fish. Toba, Japan, pp. 325–332.
- DelMar, E. G.; Largman, C.; Brodrick, J. W. and Geokas, M. C. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochemistry* 99:316–320.
- El-Sayed, A. F. M. 1998. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Feeds Aquaculture Research* 29:275–280.
- Ellefson, R. D. and Caraway, W. T. 1976. Fundamentals of clinical chemistry. In: Tietz, NW editor. Saunders W. B. Philadelphia, USA.
- Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95:271–278.
- Fagbenro, O. and Jauncey, K. 1993. Chemical and nutritional quality of raw, cooked and salted fish silages. *Food Chemistry* 48:331–335.
- Fagbenro, O. A. 1998. Apparent digestibility of various legume seed meals in Nile tilapia diets. *Aquaculture International* 6:83–87.
- Frias, J.; Vidal, C.; Sotomayor, C.; Diaz, C. and Urbano, G. 2000. Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpeas. *European Food Research and Technology* 210:340–345.
- Furukawa, A. and Tsukahara, H. 1966. On the acid digestion of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 32:502–506.
- García-Carreño ,F. L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* 3:145–150.
- García-Ulloa, M.; Gallo-García, M. C.; Ponce-Palafox, J. T.; Rodríguez-González, H. and Góngora-Gómez, A. M. 2013. Growth and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry fed with a dietary inclusion of decapsulated *Artemia* cysts. *Journal of Aquaculture In The Tropics* 28(1-4):79-88.
- Garzón, S. M. L.; Romero, M. A. and James, M. G. 1993. Quitina y quitosano para uso farmacéutico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 24(4):75.

- Goddard, J. S. and Al-Yahyai, D. S. S. 2001. Chemical and nutritional characteristics of dried sardine silage. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 10(4):39–50.
- Goddard, J. S.; McLean, E.; and Wille, K. 2003. Co-dried sardine silage as an ingredient in tilapia, *Oreochromis aureus* diets. *Journal of Aquaculture In The Tropics* 18(3):257–264.
- Goldenfarb, P. B.; Browyer, F. P.; Hall, E. E. and Brousius. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology* 56:59-68.
- Hahn, D. H.; Rooney, L. W. and Earp, C. F. 1984. Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Food World*, 29:776–779.
- Halver, J. E. and Hardy, R. W. 2002. *Fish nutrition*, Third edition. Academic Press, New York. 824 pp.
- Henry, R. J.; Cannon, D. C. and Winkelman, J. W. 1974. In “*Clinical Chemistry: Principles and Techniques*”. Pp. 687-695. Harper and Row, New York.
- Hossain, M. A. and Jauncey, K. 1993. The effects of varying dietary phytic acid, calcium and magnesium levels on the nutrition of common carp, *Cyprinus carpio*. In: RA, I.N. (Ed.), *Fish Nutrition in Practice. IVth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding*, Biarritz, France, pp. 705–715.
- Jackson, A. J.; Capper, B. S. and Matty, A. J. 1982. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia, *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture* 27:97–109.
- Job, B. E.; Antai, E. E.; Inyang-Etoh, A. P.; Otogo, G. A. and Ezekiel, H. S. 2015. Proximate composition and mineral contents of cultured and wild tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Pisces: Cichlidae) (Linnaeus, 1758). *Pakistan Journal of Nutrition* 14(4):195-200.
- Jones, P. L. and De Silva, S. S. 1997. Influence of differential movement of the marker chromic oxide and nutrients on digestibility estimations in the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Aquaculture* 154:323-336.
- Jung, W. J.; Jo, G. H.; Kuk, J. H.; and Kim, K. Y. 2006. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. Tolerans KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology 71:234-237.
- Kumar, V.; Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2011. Detoxified *Jatropha curcas* kernel meal as a dietary protein source. Growth performance, nutrient utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 17:313–326.
- Li, Y.; Moreira-Bordinhon, A.; Allen-Davies, D.; Zhang, W. and Zhu, X. 2012. Protein: energy ratio in practical diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International* 21:1109-1119.
- Lundstedt, L. M.; Melo, J. F. B. and Moraes, G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 137:331-339.
- Maynard, L. A.; Loosli, J. K.; Hintz, H. F. and Warner, R. G. 1981. *Animal Nutrition*. McGraw-Hill Book Company, New York, NY.
- McGowan, M. W.; Artiss, J. D.; Standbergh, D. R. and Zack, B. 1983. A peroxidase-coupled method for colorimetric determination of serum triglycerids. *Clinical Chemistry* 29:538-525.
- [NRC] National Research Council. 1983. Underutilized resources as animal, feedstuffs. National Academy Press, Washington, D.C., 253 p.
- [NRC] National Research Council. 1993. Committee on Animal Nutrition. Nutrient Requirements of Fish. Washington, DC, Natl Academy Press.
- Nestares, T.; Barrionuevo, M.; Urbano, G. and López-Frias, M. 1999. Effect of processing methods on the calcium, phosphorus, and phytic acid contents and nutritive utilization of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2807–2812.
- [AOAC] Official Methods of Analysis, 16th edition. 1995. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Pérez, R. 1995. Fish silage for feeding livestock. *World Anim. Rev.* 82(1):50-57.
- Richardson NL, Higgs DA, Beames RM, McBride JR. 1985. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth

- and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Nutrition* 115:553–567.
- Selle, P. H.; Ravindran, V.; Caldwell, R. A. and Bryden, L. W. 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutrition Research Reviews* 113:255–278.
- Shiau, S. Y. and Huang, S. L. 1990. Influence of varying energy levels with two protein concentrations in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) reared in seawater. *Aquaculture* 91:143–152.
- Shiau, S. Y. and Yu, Y. P. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* 179:439–446.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman, New York, USA.
- Spinelli, J.; Houle, C. R. and Wekell, J. C. 1983. The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. *Aquaculture* 30:71–83.
- Swaigood, H. E. 1996. Characteristics of milk. In: O Fennema (Ed), *Food Chemistry*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, pp. 842-878.
- Tacon, A. G. J. and Jackson, A. J. 1985. Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G.(eds). *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 119–145.
- Tengjaroenkul, B.; Smith, B. J.; Caceci, T. and Smith, S. A. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182:317-327.
- Thorne, P. J.; Wiseman, J. and Cole, D. J. A. 1990. Copra meal. P.A. Thacker, R.N. Kirkwood (Eds.), *Non-Traditional Feed Sources for Use in Swine Production*, Butterworth, London, pp. 127–134
- Toullec, R.; Mathieu, C. M. and Pion, R. 1974. Utilisation des protéines du lactosérum par le veau préruminant à l'engrais. II. Digestibilité et utilisation pour la croissance. *Annales de Zootechnie* 23(1):75–87.

- Valdez-González, F.; Gutiérrez-Dorado, R.; García-Ulloa, M. and Rodríguez-González, H. 2013. Revisión del efecto de los antinutrientes y la fibra de leguminosas en la alimentación para peces. *Ciencia Nicolaita*. Núm. 59.
- Vega-Villasante, F.; Nolasco, H. and Civera, R. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Panaeus californiensis*: I. Properties of the amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 106(3):547-550.
- Vega-Villasante, F.; Fernández, I.; Preciado, R.M.; Oliva, M.; Tovar, D. and Nolasco, H. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* (Ordway, 1863) (Crustaceae: Decapoda: Portunidae). *Bulletin of Marine Science* 65(1):1-9.
- Vega-Villasante, F.; Nolasco, H.; Adyary, F. and Carrillo-Farnes, O. 2002. Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustaceae: Galatheididae) as potential feed additive, considerations for a new fishery along the México Pacific Coast. *Hidrobiológica* 12(2).
- Versaw, W. K.; Cuppet, S. L.; Winters, D. D. and Williams, L. E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science* 54:1557–1558.
- Vidoiti, R. M.; Carneiro, D. and Macedo-Viegas, E. 2002. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33(1):57-62.
- Vielma, J.; Makinen, T.; Ekholm, P. and Koskela, J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183:349–362.
- Villarreal, H.; Civera-Cerecedo, R. and Hernández-Llamas, A. 2006. Effect of partial and total substitution of shrimp meal, fish meal and soy meal with red crab meal *Pleuroncodes planipes* (Stimpson) on the growth of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 37:293-298.

Table 1. Proximal composition (g kg⁻¹) of ingredients used in diets for *O. niloticus*.

	Ingredients ¹								
	FS	WH	BB	RC	EB	EC	CM	JM	CH
Humidity	13.8±0.07	8.21±0.06	6.92±0.04	2.09±0.03	10.85±0.1	9.58±0.08	7.87±0.99	9.07±0.12	7.70±0.01
					7				
Crude protein	39.65±0.9	80.66±0.7	83.50±0.9	43.16±3.0	24.43±0.5	21.39±0.0	20.93±0.6	55.85±0.3	19.68±0.62
	3	3	3	2	7	2	8	4	
Lipids	22.55±0.1	1.53±0.06	0.69±0.02	1.09±0.15	0.52±0.05	6.45±1.06	1.94±0.16	3.56±0.08	7.34±0.14
Ash	13.2±0.03	2.32±0.00	3.96±0.02	32.64±0.0	3.48±0.02	3.25±0.02	9.80±0.20	9.67±0.06	3.96±0.08
				9					
Crude fiber	0.20±0.03	0.42±0.01	0.62±0.05	11.42±0.5	1.03±0.15	1.67±0.01	6.99±0.28	5.54±0.34	2.25±0.06
				1					
N.F.E.	24.4	15.09	11.24	11.70	70.54	67.21	60.28	25.38	66.79

Notes: ¹Ingredients: (FS) fish silage; (WH) whey; (BB) bovine blood; (RC) red crab; (EB) extruded bean; (EC) extruded chickpea; (CM) coconut paste; (JM) *J. curcas* paste and (CH) chickpea.

Table 2. Formulation of experimental diets for *O. niloticus* (g kg⁻¹ dry matter).

Ingredients	Diets ¹									
	RD	FS	WH	BB	RC	EB	EC	CM	JM	CH
Fish meal	45.2	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
Cellulose	42.5	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2
Gelatin	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Fish oil	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Soy lecithin	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin and mineral mixture ²	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Fish silage meal	--	15.0	--	--	--	--	--	--	--	--
Whey meal	--	--	15.0	--	--	--	--	--	--	--
Bovine blood meal	--	--	--	15.0	--	--	--	--	--	--
Red crab meal	--	--	--	--	15.0	--	--	--	--	--
Extruded bean meal	--	--	--	--	--	15.0	--	--	--	--
Extruded chickpea meal	--	--	--	--	--	--	15.0	--	--	--
Coconut paste	--	--	--	--	--	--	--	15.0	--	--
<i>J. curcas</i> paste	--	--	--	--	--	--	--	--	15.0	--
Chickpea meal	--	--	--	--	--	--	--	--	--	15.0
Crude protein	27.4±0.9	29.7±0.9	30.8±0.4	30.7±0.4	28.0±1.3	26.0±0.1	25.3±0.6	24.4±0.5	28.7±0.6	21.5±1.4
Lipids	10.0±0.0	11.8±0.6	8.4±0.1	8.8±0.1	10.3±0.1	9.1±0.0	9.9±0.1	10.1±0.1	9.0±0.0	9.3±0.9
Ash	9.6±0.0	9.7±0.0	8.5±0.0	8.9±0.0	12.5±0.1	8.6±0.3	8.7±0.1	9.2±0.2	9.2±0.0	8.7±0.0
Crude fiber	20.2±2.4	17.8±0.0	20.0±0.3	17.9±1.9	18.7±1.0	16.0±1.4	20.8±0.2	20.6±1.0	16.6±0.6	21.0±0.4
N.F.E.	23.9	24.4	23.2	24.4	24.7	31.9	26.9	27.1	27.3	31.3

Energy (Kcal)	299.4	326.9	295.2	303.1	308.1	316.7	302.1	300.6	308.7	297.4
---------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Notes: ¹Diets: (RD) Reference; (FS) 15% of fish silage meal; (WH) 15% of whey meal; (BB) 15% of bovine blood meal; (RC) 15% of red crab meal; (EB) 15% of extruded bean meal; (EC) 15% of extruded chickpea meal; (CM) 15% of coconut paste; (JM) 15% of *J. curcas* meal; and (CH) 15% of chickpea meal.

² Vitamin and mineral mixture (g kg⁻¹ food): tiamin, 0.011; folic acid, 0.005; riboflavin, 0.02; piridoxin,0.011; colin, 0.275; pantotenic acid, 0.0035; niacin, 0.088; vitamin B12, 0.00001; vitamin K, 0.0044; vitamin D3, 0.000055; vitamin E, 0.04422; ascorbic acid0.375; calcium, 3.0; phosphorous, 7.0; magnesium, 0.5; iodine, 0.001; iron, 0.15; cupper, 0.003; zinc, 0.20; manganesum, 0.013; selenium,0.0004.

Table 3. Apparent digestibility coefficients of dry matter (ADC_{DM}) and protein (ADC_{CP}) and ingredients of dry matter (ADC_{IDM}) and protein (ADC_{ICP}) of experimental diets for *O. niloticus*. Means in the same column not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

Diets ¹	ADC _{DM} ²	ADC _{IDM} ³	ADC _{CP} ⁴	ADC _{ICP} ⁵
<i>Animal by-product</i>				
FS	78.9 ± 5.1 ^{ab}	79.7 ± 5.9 ^a	92.2 ± 1.6 ^a	82.6 ± 5.5 ^a
WH	78.8 ± 6.8 ^{ab}	80.4 ± 13.4 ^a	93.6 ± 1.0 ^a	89.3 ± 2.2 ^a
BB	72.9 ± 5.9 ^b	50.3 ± 17.5 ^b	74.6 ± 5.1 ^c	47.1 ± 9.4 ^b
RC	62.9 ± 7.8 ^c	28.7 ± 8.6 ^c	83.9 ± 1.6 ^b	25.2 ± 4.7 ^c
RD	83.7 ± 3.9 ^a		93.0 ± 2.0 ^a	
<i>p-value</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Plant by-product</i>				
EB	78.9 ± 4.8 ^a	67.8 ± 16.1 ^a	90.5 ± 1.7 ^{ab}	69.6 ± 8.8 ^c
EC	78.1 ± 1.1 ^{ab}	64.8 ± 3.8 ^a	90.5 ± 0.8 ^{ab}	92.0 ± 4.8 ^a
CM	71.3 ± 5.4 ^{cd}	53.0 ± 9.7 ^{ab}	90.4 ± 2.4 ^b	84.4 ± 14.4 ^{ab}
JM	73.0 ± 1.7 ^{bc}	47.9 ± 5.6 ^b	87.9 ± 0.7 ^{bc}	37.7 ± 2.0 ^d
CH	66.6 ± 4.7 ^d	33.2 ± 10.3 ^c	86.9 ± 2.3 ^c	75.2 ± 13.6 ^{bc}
RD	83.7 ± 3.9 ^a		93.0 ± 2.0 ^a	
<i>P-value</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Notes: ¹ Diets (30% of ingredients were used in all diets): (RD) Reference; (FS) fish silage meal; (WH) whey meal; (BB) bovine blood meal; (RC) red crab meal; (EB) extruded bean meal; (EC) extruded chickpea meal; (CM) coconut paste; (JM) *J. curcas* meal; and (CH) chickpea meal.

² Apparent Digestibility Coefficient Dry Matter

³ Apparent Digestibility Coefficient Dry Matter of Ingredient

⁴ Apparent Digestibility Coefficient of Crude Protein

⁵ Apparent Digestibility Coefficient Crude Protein of ingredient

Table 4. Growth parameters, feed efficiency and somatic indexes of tilapia fed diets containing animal and plant by-products Means in the same column not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

Diets ¹	IBW	FBW	TL	SGR	WG	FCR	FER	PER	HSI	ISI
<i>Animal by-product</i>										
FS	0.86±0.1	19.33±4.0 ^{bc}	11.4±1.1	4.8±0.1	92.3±19.7	1.6±0.0	61.2±0.8	1.9±0.0 ^a	2.4±0.2	5.4±0.5
WH	0.86±0.2	22.29±3.7 ^{ab}	10.7±1.4	5.0±0.2	107.2±17.9	1.7±0.1	58.9±4.6	1.7±0.1 ^{ab}	2.9±0.7	5.5±0.3
BB	1.14±0.1	19.51±3.9 ^{bc}	10.5±0.8	4.3±0.4	91.9±19.4	1.9±0.1	52.2±3.6	1.5±0.1 ^c	2.4±0.4	5.1±1.5
RC	0.98±0.3	23.30±1.1 ^a	11.7±0.3	4.8±0.4	111.6±5.6	1.8±0.2	57.2±6.7	1.9±0.2 ^a	2.1±0.1	4.6±0.5
RD	0.96±0.2	21.28±2.2 ^b	10.7±0.2	4.6±0.2	89.7±10.5	1.9±0.1	51.8±3.4	1.7±0.1 ^{ab}	2.1±0.4	4.4±0.6
P-value	0.364	0.510	0.415	0.184	0.354	0.097	0.084	0.031	0.192	0.377
<i>Plant by-product</i>										
EB	0.82±0.1	22.41±1.3 ^a	11.4±0.1	4.9±0.4	100.2±11.3	1.8±0.2	55.2±5.2	1.9±0.2	2.5±0.1	5.5±0.4
EC	1.05±0.3	23.60±2.8 ^a	10.8±1.1	4.7±0.2	105.5±25.2	1.8±0.2	56.6±6.9	2.0±0.2	2.6±0.3	5.0±0.8
CM	0.97±0.2	19.04±0.6 ^b	10.3±0.6	4.5±0.1	90.4±2.1	1.9±0.2	52.2±4.0	2.0±0.1	2.1±0.3	5.1±0.7
JM	0.89±0.2	18.77±2.1 ^b	11.4±0.9	4.6±0.2	89.4±10.4	1.7±0.1	58.1±3.7	1.9±0.1	2.5±0.7	5.1±0.6
CH	0.99±0.1	22.06±4.0 ^a	11.5±0.6	4.5±0.3	102.4±25.0	1.9±0.4	53.0±9.1	2.3±0.4	2.9±0.9	4.8±0.7
RD	0.96±0.2	21.28±2.2 ^a	10.7±0.2	4.6±0.3	89.7±10.5	1.9±0.1	51.8±3.4	1.7±0.1	2.1±0.4	4.4±0.6

P-value 0.733 0.167 0.249 0.311 0.709 0.733 0.701 0.174 0.327 0.495

Notes: ¹ Diets: (FS) fish silage; (WH) whey; (BB) bovine blood; (RC) red crab; (EB) extruded bean; (EC) extruded chickpea; (CM) coconut paste; (JM) *J. curcas* paste, (CH) chickpea and (RD) references.

IBW (g) = Initial body weight

FBW (g) = Final body weight

TL (cm) = Total Length

SGR = Specific Growth Rate

WG (g) = Weight Gain

FCR = Feed Conversion Ratio

FER = Feed Efficiency Ratio

PER = Protein Efficiency Ratio

HSI = Hepatosomatic Index

ISI = Intestinal Somatic Index

Table 5. Hematological, biochemical parameters (mg dL⁻¹) and digestive enzyme activity (UT) of tilapia fed diets containing animal and plant by-products. Means in the same column not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

Diets	<i>Hematological parameters</i>				<i>Digestive enzymes</i>				
	HEM	GLU	TCH	TG	Protease	Trypsin	Chymotrypsin	Amylase	Lipase
<i>Animal by-product</i>									
FS	27.5±5.0	138.0±11.3 ^{ab}	260.5±16.3 ^a	389.0±124.5 ^a	171.3±29.4 ^a	20806.6±2590.9 ^a	128509.7±12372.4 ^a	116.5±16.2 ^a	19.0±1.4 ^a
WH	27.8±1.9	174.5±9.2 ^a	242.3±24.2 ^{ab}	284.0±31.1 ^{ab}	48.4±7.9 ^d	5007.7±1135.7 ^d	49435.3±13014.9 ^d	26.5±6.3 ^d	16.7±0.8 ^{ab}
BB	22.8±4.6	104.0±11.3 ^b	174.0±17.0 ^c	130.0±19.8 ^b	79.7±23.4 ^c	10777.2±2583.9 ^c	68964.0±3051.8 ^c	52.1±18.3 ^c	15.4±5.7 ^{ab}
RC	29.3±4.3	110.5±3.5 ^b	200.7±18.8 ^{ab} c	179.0±14.1 ^b	129.3±8.5 ^b	14409.6±3472.6 ^b	67000.0±11053.3 ^c	58.5±14.8 ^c	16.3±1.3 ^{ab}
RD	31.2±3.8	105.3±11.2 ^b	197.3±16.8 ^{bc}	177.7±7.8 ^b	110.7±9.1 ^b	14670.1±2410.4 ^b	96573.2±10236.5 ^b	97.5±13.1 ^b	12.6±2.5 ^b
P-value	0.215	0.001	0.008	0.015	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.005
<i>Plant by-product</i>									
EB	25.5±0.0	116.0±0.0 ^{ab}	192.0±0.0 ^{ab}	146.0±0.0 ^c	146.5±9.5 ^a	12999.7±703.5 ^{bc}	144202.8±9204.5 ^a	131.0±9.2 ^a	15.3±2.2 ^{bc}
EC	28.0±5.8	119.5±0.7 ^{ab}	211.5±10.6 ^{ab}	195.0±24.0 ^{bc}	102.3±15.5 ^c	10724.6±435.5 ^c	123296.7±11040.4 ^b	63.9±3.0 ^c	29.9±3.9 ^a
CM	27.2±8.8	98.7±7.5 ^b	254.0±11.3 ^a	304.0±1.4 ^a	142.6±14.2 ^a	16381.3±2413.9 ^a	132805.5±13378.0 ^{ab}	127.5±17.3 ^a	32.0±4.3 ^a
JM	29.8±3.1	130.3±8.4 ^a	208.3±21.6 ^{ab}	229.5±2.1 ^b	79.7±9.5 ^d	7102.1±882.8 ^d	55740.7±4126.3 ^d	54.9±10.0 ^c	14.1±1.2 ^c

CH	26.8±7.5	123.0±15.6 ^{ab}	182.0±18.2 ^b	157.5±9.2 ^c	125.8±23.1 ^{ab}	13961.3±3312.3 ^{ab}	131950.7±24011.9 ^{ab}	102.2±9.6 ^b	19.4±5.6 ^b
RD	31.2±3.8	105.3±11.2 ^{ab}	197.3±16.8 ^{ab}	177.7±7.8 ^c	110.7±9.1 ^{bc}	14670.1±2410.4 ^{ab}	96573.2±10236.5 ^c	97.5±13.1 ^b	12.6±2.5 ^c
P-value	0.923	0.037	0.029	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Notes: ¹Diets: (RD) Reference; (FS) 15% of fish silage meal; (WH) 15% of whey meal; (BB) 15% of bovine blood meal; (RC) 15% of red crab meal; (EB) 15% of extruded bean meal; (EC) 15% of extruded chickpea meal; (CM) 15% of coconut paste; (JM) 15% of *J. curcas* meal; and (CH) 15% of chickpea meal.

HEM = Hematocrit (%)

GLU = Glucose (mg dL⁻¹)

TCH = Total cholesterol (mg dL⁻¹)

TG = Triglyceride (mg dL⁻¹)

Table 6. Chemical composition of fish body (g kg⁻¹ dry weight). Means in the same column not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

Diets ¹	Crude protein	Lipid	Ash	Crude fiber	NFE ²
<i>Animal by-product</i>					
FS	59.0±1.9	18.0±0.2 ^{bc}	16.4±0.9 ^a	0.3±0.0 ^c	6.2
WH	58.6±0.4	19.7±0.4 ^{ab}	13.4±0.4 ^b	1.2±0.1 ^b	7.4
BB	57.3±0.9	21.3±0.7 ^a	13.2±0.3 ^b	2.3±0.1 ^a	5.3
RC	59.1±0.6	20.3±1.3 ^{ab}	14.9±0.1 ^{ab}	1.3±0.1 ^c	4.9
RD	60.0±0.8	15.5±0.0 ^c	16.3±0.4 ^a	1.4±0.1 ^b	6.8
P-value	0.273	0.002	0.003	<0.001	0.379
<i>Plant by-product</i>					
EB	57.5±0.1	21.2±1.2 ^a	14.2±0.1 ^b	1.7±0.1 ^b	5.4
EC	57.8±0.8	21.3±1.3 ^a	14.1±0.1 ^{bc}	0.4±0.1 ^c	5.9
CM	58.5±1.0	17.3±0.3 ^b	14.2±0.4 ^b	1.3±0.1 ^b	8.7
JM	58.6±1.0	21.6±0.4 ^a	13.1±0.0 ^{bc}	0.4±0.0 ^c	6.1

CH	58.2±0.4	22.1±0.6 ^a	12.9±0.5 ^c	2.5±0.1 ^a	4.0
RD	60.0±0.8	15.5±0.0 ^b	16.3±0.4 ^a	1.4±0.1 ^b	6.8
P-value	0.078	<0.001	<0.001	<0.001	0.227

Notes: ¹ Diets: (FS) fish silage; (WH) whey; (BB) bovine blood; (RC) red crab; (EB) extruded bean; (EC) extruded chickpea; (CM) coconut paste; (JM) *J. curcas* paste, (CH) chickpea and (RD) references.

² NFE: Nitrogen free extract

Table 7. Regression equations relating response parameters apparent digestibility coefficients (ADCs), final body weight (FBW), total length (TL), specific growth rate (SGR), weight gain (WG), feed conversion ratio (FCR), feed efficiency ratio (FER), protein efficiency ratio (PER), and with hematocrit (HEM) and chymotrypsin activity (chy)

Y	X	Regression equation	r	P
ADC _{IC}	chy	$y = 0.00038x + 29.636$	0.57	0.003
P				
PER	chy	$y = 0.0000033x + 1.5901$	0.46	0.019
ADC _{CP}	SGR	$y = 8.132x + 49.863$	0.44	0.028
FBW	HEM	$y = 0.30103x + 12.756$	0.49	0.013
TL	HEM	$y = 0.10368x + 8.2194$	0.58	0.003
WG	HEM	$y = 1.6499x + 53.756$	0.49	0.013
FCR	HEM	$y = -0.0227x + 2.4255$	0.59	0.002
FER	HEM	$y = 0.10368x + 8.2194$	0.59	0.002
PER	HEM	$y = 0.02644x + 1.1838$	0.51	0.009

Acknowledgements

Funding was provided by Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN 20120542 y 20131517), and COFAA and EDI. Montoya-Mejía M. is a recipient of a doctoral fellowship from CONACYT and Instituto Politécnico Nacional (BEIFI Grant).