



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ELABORACIÓN DE MICRODIETAS  
SUPLEMENTADAS CON LEVADURA *Debaryomyces  
hansenii* PARA LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS  
DE PECES MARINOS**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

**Violeta Gleaves López**

La Paz, B.C.S. Agosto de 2009

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 13 del Mes de julio del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Elaboración de microdietas suplementadas con levadura *Debaryomyces hansenii* para la alimentación de larvas de peces marinos"**

Presentada por el alumno:

**Violeta Gleaves López**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

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

### LA COMISION REVISORA

  
Dr. Daríel Tovar Ramírez  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. Roberto Civera Cerecedo  
CO-TUTOR

  
Dr. Vicente Gracia López  
CO-TUTOR

  
DRA. ELVA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL Y REVISIÓN DE TESIS**

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Director de Tesis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

Dr. Vicente Gracia López  
Asesor  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

Dr. Roberto Civera Cerecedo  
Asesor  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Vicente Gracia López  
Dr. Roberto Civera Cerecedo

## **SUPLENTES**

Dr. Renato Peña Martínez  
Dr. Humberto Villarreal Colmenares

## RESUMEN

La sustitución de alimento vivo por alimento inerte trae como consecuencia la necesidad de realizar esfuerzos en la investigación para la búsqueda de una partícula capaz de reemplazar eficazmente el alimento vivo. Dentro de este contexto, nuestro principal objetivo es la obtención de dos tipos de microdietas funcionales; microcápsulas y microagregados de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro a los cuales se les incorporó la levadura viva *Debaryomyces hansenii* como probiótico. Las microcápsulas fueron elaboradas mediante gelificación interna con alginato de calcio al 2% y una inclusión de levaduras equivalente a  $10^6$  UFC/g. Por otro lado, se elaboraron dietas microagregadas partiendo de dos alimentos microparticulados (experimental y BERNAQUA®), a los cuales se les incluyó la levadura mediante aspersión utilizando aceite de hígado de bacalao y alginato al 2% como ligantes. Una vez elaboradas las microdietas, se analizó la capacidad de hidrólisis de dichas formulaciones mediante digestibilidad *in vitro* de proteínas, lípidos y polisacáridos. Dichos análisis fueron realizados utilizando extractos crudos del sistema digestivo de ejemplares juveniles de 2 especies de peces marinos con gran potencial para acuicultura: cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) y pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*). Nuestros resultados mostraron que el grado de hidrólisis del ligante se encuentra relacionado con los hábitos alimenticios de la especie, ya que para el pargo amarillo se encontró un mayor grado de hidrólisis en los microagregados elaborados con aceite de hígado de bacalao en la digestibilidad *in vitro* de polisacáridos y en la digestibilidad *in vitro* de proteínas los microagregados con inclusión de levadura con aceite y alginato no mostraron diferencia significativa ( $P > 0.005$ ). Mientras que para la cabrilla arenera el mayor grado de hidrólisis se encontró en los microagregados elaborados con alginato al 2 % en la digestibilidad *in vitro* de polisacáridos, mientras que en la digestibilidad *in vitro* de proteínas no se observaron diferencias significativas entre los microagregados. Por otra parte, la mejor técnica para la encapsulación de las levaduras vivas es la gelificación interna con alginato de calcio, utilizando hidrolizado de calamar como attractante, ya que este ingrediente confiere una mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas en ambas especies.

**Palabras clave:** *Paralabrax maculatofasciatus*, *Lutjanus argentiventris*, probióticos, levaduras, *Debaryomyces hansenii*, microcápsulas, microagregados, digestibilidad *in vitro*, hidrólisis.

## ABSTRACT

Substitution of live prey by inert food has resulted in the need for a major research effort for finding a particle capable for an effectively replacing live feed. Within this context, our main objective is to obtain two types of functional microdiets; microcapsules and microbound under 50 to 100µm in diameter, which were supplemented with live yeast *Debaryomyces hansenii* as probiotic. Microcapsules were prepared by internal gelling calcium alginate 2% and an inclusion of yeast equivalent to 10<sup>6</sup> CFU/g. Furthermore, microbound diets were prepared using two types of microparticulate diets (experimental elaborated diet and a commercial diet BERNAQUA®), which were included with yeast by spraying using cod liver oil and 2% alginate as a binder. Once developed the microdiets, their proteins, lipids and carbohydrates *in vitro* hydrolysis were analyzed. Such analysis was performed using crude extracts of the digestive system of juvenile spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) and yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*) which represent two species with great potential for marine aquaculture in northwest of Mexico. Our results showed that the degree of hydrolysis of the binder is related to the feeding habits of the species, for the yellow snapper we found a higher degree of polysaccharide hydrolysis in microbound made with cod liver oil, protein digestibility of microbound including oil and yeast with alginate showed no significant difference ( $P > 0.005$ ). The spotted sand bass showed the higher polysaccharides *in vitro* hydrolysis in microbound made with 2% alginate, whereas the protein *in vitro* digestibility showed no significant differences between microbounds. Moreover, the best technique for the encapsulation of live yeast is the internal gelling calcium alginate, using squid hydrolyzate as attractante, since this ingredient gives a higher *in vitro* digestibility of protein in both species.

**Key words:** *Paralabrax maculatofasciatus*, *Lutjanus argentiventris*, probiotics, yeast, *Debaryomyces hansenii*, microcapsules, microbound, *in vitro* digestibility, hydrolysis.

## DEDICATORIA

A mis padres Leonor López Rosas y Jorge Guillermo Gleaves Olvera quienes a pesar de la distancia siempre he recibido su amor y apoyo en cualquier circunstancia. Gracias por sus valiosos consejos e impulsarme a seguir y luchar por mis sueños.

A mi hermano Jorge por su apoyo a la distancia, además de sus ocurrencias en cada momento.

A Gastón Bazzino quien siempre ha estado ahí en las buenas y malas tirándome para arriba cuando lo necesitaba, por su amor, consejos y apoyo para cumplir mis sueños.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACyT y posgrado del CIBNOR por todo el apoyo otorgado, beca 204097 y al proyecto SAGARPA-CONACyT 2004-044.

Al comité tutorial Dr. Dariel Tovar Ramírez como director y asesores Dr. Roberto Civera Cerecedo y Dr. Vicente Gracia López, por su apoyo y revisiones durante la realización de la tesis de maestría.

Al Dr. Francisco Javier Moyano López, por permitirme realizar la estancia de investigación en su laboratorio, en donde fueron elaboradas las microcápsulas de levadura, utilizadas en este trabajo. También quiero agradecerle por su tiempo, apoyo y consejos para la mejor sustentación del trabajo. Así como también a todo el equipo de laboratorio y al cDr. Miguel Ángel Saenz de Rodrigañez por su ayuda en la elaboración de las microcápsulas.

Al Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola (CIBNOR) por la donación de juveniles de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) y al Dr. Martín Oscar Rosales Velázquez (CICIMAR) por la donación de juveniles de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), material indispensable para la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Nolasco Soria por su ayuda en el análisis de las muestras a lo que respecta a la digestibilidad *in vitro* de polisacáridos, proteínas y lípidos.

Al Dr. Renato Peña Martínez (CICIMAR) quiero agradecerle muy especialmente por echarme la mano cuando pensé que ya todo estaba perdido y por su apoyo emocional.

Al Dr. Humberto Villarreal Colmenares quiero agradecerle su ayuda y consejos para entender con lógica los resultados del trabajo.

A mis padres y hermano les agradezco principalmente por todo el apoyo emocional, consejos a través del proceso de tesis, en los momentos difíciles y alegrías en los momentos de festejos. También quiero agradecerles por su apoyo económico por la beca materna como paterna, la cual me ayudo a subsistir en el año sin beca.

A Gastón Bazzino que siempre ha estado ahí en las buenas compartiendo alegrías y risas, así como en los momentos malos, siempre tirándome para arriba y dándome consejos útiles o simplemente escuchando en los momentos en los que necesitaba desahogarme. Por toda su ayuda con la estadística y correcciones de redacción, a pesar de no ser su área, pero lo más importante por compartir muchos momentos juntos.

A mi Tía Teresa y Brissia por todo se apoyo y laaaaaargas platicas, momentos que me ayudaron bastante para agarrar fuerzas y seguir con todas las ganas.

A mis amigos (familia paceña) por su apoyo y consejos, especialmente a Licha, Chucho, Hever y Paola con los que he contado incondicionalmente no solo para el relax, chistes, risas, sino también por su apoyo en los momentos complicados, escuchando cuando necesitaba consuelo y ánimo. También por decirme las cosas como son cuando me equivocaba.

A mis amigas y amigos de la maestría Rosalva, Yssel, Natalia, Cointa, David, Mónica, Miguel y Marlene así como también a los grandes amigos de la estancia en España, Gerardo, Gabriel y Mariam por todos los momentos chidos, por hacerme olvidar del estrés y los malos ratos cambiándolos por buenos inyectándome energía para seguir adelante, dándome su apoyo y dispuestos a luchar contra todo. A Carlos Fletes y Maciel (mi alumnito) por su ayuda y ánimo en la instalación del sistema que nunca use.



A la bióloga Patricia Hinojosa por sus consejos, pláticas, risas y desfogues de las vicisitudes que surgen en la elaboración de las tesis, pero sobre todo por sus porras constantes. También quiero agradecer a Ariel Arturo Cruz Villacorta por el apoyo con la microscopía electrónica de barrido.

Al Arnulfo compañero fiel y constante, que tan solo con un lengüetazo tiene el poder de subirme el ánimo.

Y por último y no menos importante a mis maestros y amigos de baile Lizzy y Lalo, puesto que sin el baile me hubiera vuelto loca en todo este proceso, además de ayudarme a despejar la mente y hacer las horas mas productivas en frente de la computadora.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biología larval.....	1
1.2 Alimentación y nutrición de larvas de peces marinos.....	5
1.3 Probióticos.....	9
1.4 Digestibilidad.....	11
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>20</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
7.1 Producción de biomasa de levadura <i>D. hansenii</i> .....	21
7.2 Encapsulación de levadura <i>D. hansenii</i> con alginato de sodio.....	21
7.2.1 Evaluación inicial de la proporción más adecuada de alginato en la encapsulación.....	21
7.2.2 Evaluación visual de la inclusión efectiva de las levaduras en las microcápsulas.....	22
7.2.3 Evaluación de la viabilidad y cuantificación de UFC/g de microcápsulas frescas tras el proceso de encapsulación.....	22
7.2.4 Evaluación de la viabilidad y cuantificación de UFC de levadura <i>D. hansenii</i> sometida al proceso de liofilización.....	23
7.2.5 Inclusión definitiva de levadura liofilizada en microcápsulas....	23
7.2.6 Preparación de microcápsulas enriquecidas con hidrolizado de calamar como agente attractante.....	23
7.2.7 Obtención de micrografías de las microcápsulas con microscopio electrónico de barrido.....	24
7.3 Elaboración de dieta microparticulada.....	25
7.4 Elaboración de microagregados con inclusión de levadura viva <i>D. hansenii</i> .....	26
7.4.1 Micrografías de microdietas.....	29
7.5 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las microdietas utilizando extractos	

digestivos de cabrilla arenera ( <i>P. maculatofasciatus</i> ) y pargo amarillo ( <i>L. argentiventris</i> ).....	29
7.5.1 Obtención de extractos.....	29
7.5.2 Determinación de proteína soluble (Bradford, 1976).....	30
7.5.3 Métodos para la determinación de actividad enzimática específica .....	30
7.5.3.1 Pepsina o proteasa ácida (Anson, 1983).....	31
7.5.3.2 Actividad de proteasa (Divakaran y Ostrowski, 1990).....	31
7.5.3.3 Actividad tripsina (Erlanger <i>et al.</i> , 1961).....	32
7.5.3.4 Actividad lipasa (Versaw <i>et al.</i> , 1989).....	32
7.5.3.5 Actividad amilasa (Vega.Villasante <i>et al.</i> ,1993).....	33
7.6 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las microdietas.....	33
7.6.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos.....	33
7.6.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas.....	34
7.6.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas mediante pH-Stat (Esquerra <i>et al.</i> , 1998).....	35
7.6.4 Digestibilidad <i>in vitro</i> de lípidos (Nolasco, 2006).....	36
7.7 Análisis estadísticos.....	37
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
8.1 Elaboración de microcápsulas con alginato de sodio.....	38
8.2 Inclusión de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) en las microcápsulas.....	38
8.3 Inclusión de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) en alimento comercial BERNAQUA.....	39
8.4 Inclusión de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) en alimento experimental.....	40
8.5 Análisis químicos proximales de las microdietas.....	41
8.6 Actividad específica de los extractos del tracto digestivo de <i>P. maculatofasciatus</i> y <i>L. argentiventris</i> .....	41
8.7 Digestibilidad <i>in vitro</i> de los alimentos.....	43
8.7.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de los ligantes.....	43
8.7.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de lípidos de aceite de hígado de bacalao como ligante.....	45
8.7.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de las microdietas.....	46
8.7.4 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas (pepsina).....	50
8.7.5 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas para tripsina por pH Stat.....	54
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
9.1 Microencapsulación de levadura viva <i>D. hansenii</i> .....	59

9.2	Concentración de alginato en microcápsulas de levadura <i>D. hansenii</i> ...	62
9.3	Tamaño de las microcápsulas de levadura <i>D. hansenii</i> .....	63
9.4	Elaboración de microagregados con inclusión de levadura viva ( <i>D. hansenii</i> ).....	63
9.5	Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de los ligantes.....	65
9.6	Digestibilidad <i>in vitro</i> de lípidos de aceite de hígado de bacalao como ligante.....	66
9.7	Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de las microdietas.....	67
9.8	Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas específica para pepsina.....	70
9.9	Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas para tripsina por pH Stat.....	72
10.	CONCLUSIONES.....	75
11.	PERSPECTIVAS.....	77
12.	REFERENCIAS.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Micrografía electrónica de barrido de microcápsulas de alginato con inclusión de levadura <i>D. hansenii</i> a una concentración de $1.16 \times 10^6$ UFC menores de $50\mu\text{m}$ de diámetro.....	38
<b>Figura 2.</b> Micrografía electrónica de barrido de microdietas con la levadura viva ( <i>D. hansenii</i> ) incluida, elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA con ligantes distintos A) microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) B) microagregado BERNAQUA con alginato de sodio (MBAL) C) alimento comercial BERNAQUA sin la inclusión de levadura (MB).....	39
<b>Figura 3.</b> Micrografía electrónica de barrido de la inclusión de levadura viva ( <i>D. hansenii</i> ) en las microdietas elaboradas con el alimento formulado con ligantes distintos A) Microagregado formulado elaborado con alginato de sodio (MFAL), B)Microagregado formulado elaborado con aceite de aceite de pescado (MFAC), C) Microparticulado formulado sin inclusión de levadura (MF).....	40
<b>Figura 4.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de almidón, alginato 2% y microcápsulas con extracto crudo del tracto digestivo de la cabrilla arenera ( <i>P. maculatofasciatus</i> ).....	43
<b>Figura 5.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de almidón, alginato 2% y microcápsulas con extracto digestivo de pargo amarillo ( <i>L. argentiventris</i> ).....	44
<b>Figura 6.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de lípidos de aceite de hígado de bacalao utilizado como ligante de levadura en algunos microagregados utilizando extracto crudo del tracto digestivo de la cabrilla arenera y pargo amarillo.....	45
<b>Figura 7.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera ( <i>P. maculatofasciatus</i> ).....	46

<b>Figura 8.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera ( <i>P. maculatofasciatus</i> ).....	47
<b>Figura 9.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo ( <i>L. argentiventris</i> ).....	48
<b>Figura 10.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de polisacáridos de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo ( <i>L. argentiventris</i> ).....	49
<b>Figura 11.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas de: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera ( <i>P. maculatofasciatus</i> ).....	50
<b>Figura 12.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera ( <i>P. maculatofasciatus</i> ).....	51
<b>Figura 13.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas de: microagregado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo ( <i>L. argentiventris</i> ).....	52
<b>Figura 14.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo ( <i>L. argentiventris</i> ).....	53

<b>Figura 15.</b> Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de <i>P. maculatofasciatus</i> : microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera.....	<b>54</b>
<b>Figura 16.</b> Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de <i>P. maculatofasciatus</i> : microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas (MC).....	<b>56</b>
<b>Figura 17.</b> Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de <i>L. argentiventris</i> : microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas (MC).....	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b> Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de <i>L. argentiventris</i> : microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas (MC).....	<b>58</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Formulación utilizada para la fabricación de la dieta microparticulada.....	25
<b>Tabla II.</b> Ingredientes del alimento comercial BERNAQUA® tipo caviar (50-100µm).....	27
<b>Tabla III.</b> Composición químico proximal del alimento comercial BERNAQUA® tipo caviar (50-100µm) reportada por el fabricante .....	27
<b>Tabla IV.</b> Resultados de análisis químico proximal de las microdietas con inclusión de levadura marina ( <i>D. hansenii</i> ).....	41
<b>Tabla V.</b> Actividad específica de las enzimas digestivas en juveniles de cabrilla arenera <i>P. maculatofasciatus</i> <i>P. maculatofasciatus</i> (peso = 9.5g).....	42
<b>Tabla VI.</b> Actividad específica de las enzimas digestivas en juveniles de pargo amarillo <i>L. argentiventris</i> (peso = 2.0g).....	42
<b>Tabla VII.</b> Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento formulado utilizando extracto digestivo de <i>P. maculatofasciatus</i> .....	55
<b>Tabla VIII.</b> Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA utilizando extracto digestivo de <i>P. maculatofasciatus</i> .....	56
<b>TABLA IX.</b> Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento formulado utilizando extracto digestivo de pargo amarillo.....	57
<b>TABLA X.</b> Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA utilizando extracto digestivo de pargo amarillo.....	58



## 1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, muchos países de América Latina han incrementado el interés por el cultivo de peces marinos. No obstante, a pesar del potencial existente para la acuicultura marina, la producción de peces en granjas de agua salada es aún limitada, ya que es una nueva actividad en esta región (García-Ortega, 2008) y debido a que la producción de especies de peces marinos para acuicultura depende enormemente de la habilidad de criar exitosamente el estadio larvario (Lazo *et al.*, 2007).

El suministro de larvas de peces marinos de buena calidad para la acuicultura ha mejorado en años recientes debido a los avances tecnológicos y científicos. Sin embargo, para muchas especies, la producción masiva de juveniles sigue estando obstaculizada por el conocimiento limitado de los requerimientos nutricionales y al pobre conocimiento de la fisiología digestiva y nutricional en las larvas, ya que estos aspectos son esenciales para el reemplazo efectivo del alimento vivo por microdietas inertes (Conceição *et al.*, 2007). Por ello, se en este trabajo se pretende elaborar dietas microagregadas suplementadas con levadura *D. hansenii*, así como la encapsulación de la misma y determinar la digestibilidad de ambos tipos de microdietas utilizando métodos *in vitro* con extractos digestivos de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) y pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*).

### 1.1 BIOLOGÍA LARVAL

El período larvario comprende tres fases; preflexión, flexión y posflexión, que abarcan desde la absorción del saco vitelino hasta el desarrollo completo de los elementos de aletas pares e impares (Ortíz-Galindo, 1991). Con lo que respecta a la alimentación, el desarrollo del tracto alimentario presenta cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos que están sincronizados por procesos

genéticos y ambientales, así como también por la influencia de los niveles de algunos nutrientes incorporados en la dieta (Alvarez-González, 2003).

**a) Ontogenia digestiva en larvas de peces marinos**

Los estudios relacionados con el desarrollo ontogénico del tracto digestivo en larvas de peces marinos, representan un paso inicial para la identificación e implementación de nuevas alternativas alimenticias para éstas, permitiendo la identificación de los componentes morfológicos implicados en la digestión, junto con los estudios enzimológicos, los cuales permiten tener el conocimiento del momento propicio para el reemplazo alimenticio en las larvas (Peña *et al.*, 2003).

El tracto digestivo en larvas de peces marinos se encuentra pobremente desarrollado al momento de la eclosión (Sarasquete *et al.*, 1993), y la mayoría de las especies marinas potenciales para acuicultura cuentan con un sistema digestivo inmaduro al momento de la alimentación exógena (Peña *et al.*, 2003; Rønnestad *et al.*, 2007).

El grado de ingestión y digestión durante la etapa larval, así como la eficiencia de asimilación, se van adaptando para optimizar el crecimiento de la larva (Sarasquete *et al.*, 1993); más aún, el hígado, páncreas y vesícula biliar se encuentran diferenciados al momento de la eclosión y son funcionales antes de la primera alimentación en muchas especies de peces marinos (Govoni *et al.*, 1986; Boulhic y Gabaudan, 1992; Segner *et al.*, 1994; Kurokawa y Suzuki, 1996; Ribeiro *et al.*, 1999). Sin embargo, en muchos teleósteos el estómago y los ciegos pilóricos no se encuentran desarrollados sino hasta el momento de la transformación a juveniles (Cahu y Zambonino, 2001; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004).

### **b) Enzimas digestivas en larvas de peces marinos**

La digestión de los nutrientes ocurre en el tracto gastrointestinal y es catalizada por enzimas estomacales, pancreáticas e intestinales. El proceso incluye la absorción y transporte de los nutrientes a través de las células intestinales (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

#### **Proteasa ácida o pepsina**

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Algunas están implicadas en procesos como la digestión, la activación de proenzimas y prehormonas (Stroud, 1975). La proteasa ácida, aspártica (EC 3.4.23.1) se encuentra bajo la categoría de las endopeptidasas, ya que hidrolizan enlaces peptídicos internos. Se caracteriza por la presencia de ácido aspártico en el centro activo y su máximo actividad se encuentra en pH ácido (Alvarez-González, 2003). La actividad de las proteasas ácidas se encuentra principalmente en el estómago. (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

#### **Lipasa**

La lipasa pancreática, acilglicerol acilhidrolasa o lipasa triaglicerol (E.C. 3.1.1.3) es una enzima con una alta especificidad para la hidrólisis de triacilglicéridos como sustratos (Iijima *et al.*, 1998). Por su parte, la lipasa activada por sales biliares (BAL), también llamada como lipasa carboxiléster, lipasa dependiente de sales biliares o colesterol esterasa (E.C. 3.1.1.1), cataliza la hidrólisis de los enlaces carboxiléster y no únicamente de los acilgliceroles; además de realizar la digestión de colesterol éster y éster de vitaminas (A, D y E) en conjunto con otras lipasas digestivas (Gjellesvik *et al.*, 1994). La existencia de los dos tipos de lipasa en larvas de peces marinos se atribuye a dos factores principalmente: la absorción del saco vitelino rico en fosfolípidos, y su relación con la digestión exógena (Cara *et al.*, 2003).

### **Amilasa**

La digestión y absorción de los carbohidratos aparentemente se lleva a cabo por la misma ruta general en especies herbívoras, omnívoras y carnívoras (Krogdahl *et al.*, 2005). La enzima  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha(1 \rightarrow 4)$  D-glucano glucanohidrolasa (EC 3.2.1.1) cataliza la endohidrólisis en enlaces glucosídicos  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  en almidón y moléculas similares a oligosacáridos cortos, incluyendo maltotriosa y maltosa (Krogdahl *et al.*, 2005).

El nivel de secreción de amilasa está determinado por los hábitos alimenticios y las especies. Es producida en cantidades significantes por diferentes partes del tracto digestivo en peces herbívoros; y menos abundante en peces carnívoros, que la secretan en el páncreas (Fernández *et al.*, 2001).

### **Tripsina**

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una de las mayores proteínas en los sistemas digestivos de los animales, ya que actúa como elemento clave y mediador durante la ingesta y asimilación de alimentos (Wu y Jiang, 2007). Asimismo es una enzima principal para la utilización alimenticia y crecimiento por su papel en el proceso de la digestión proteica (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006). Es una endopeptidasa que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 está conformado por arginina o lisina (Spilliaert y Gudmundsóttir, 1999), así como la habilidad de activar otras proteasas pancreáticas como; la quimotripsina (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008; Sunde *et al.*, 2004). Esta enzima se encuentra en isoformas distintas en los ciegos pilóricos e intestino, además de presentar diferente distribución (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006).

## **1.2 ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN DE LARVAS DE PECES MARINOS**

La alimentación de larvas de peces marinos durante la primera semana de desarrollo depende de presas vivas, cuyo costo de producción y mantenimiento suele ser elevado, y cuya dependencia en la gran mayoría de cultivos larvarios se asocia principalmente para asegurar un desarrollo larval exitoso hasta el momento de la transformación (Langdon *et al.*, 2007).

Por otra parte, la alimentación exógena es un momento crucial en el desarrollo en las larvas de peces marinos, además de encontrarse asociada con mortalidades masivas tanto en poblaciones naturales como en cultivo (Yúfera y Darias, 2007). Sin embargo, la sustitución de alimento vivo por alimento inerte es esencial para disminuir costos de producción y para sostener una alta calidad y producción constante de juveniles. Hasta el momento la sustitución del alimento vivo se realiza después de algunas semanas de vida en peces marinos (Cahu y Zambonino-Infante, 2001) ya que la habilidad de la larva para asimilar los nutrientes depende de la composición de la dieta y de la capacidad de modular las enzimas digestivas y procesos metabólicos (Zambonino-Infante y Cahu, 2007).

La formulación de dietas compuestas adecuadas para larvas de peces no se logra fácilmente, puesto que la estimación de requerimientos nutricionales para larvas de peces no se lleva a cabo con métodos tradicionales (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). El primer factor se debe a que la mayoría de las larvas de peces marinos son pequeñas (~2-3 mm) al inicio de la alimentación exógena. El segundo factor se debe a que también la apertura bucal es reducida, por lo que se requiere un tamaño chico de partículas del alimento (~ 50 – 150  $\mu\text{m}$ ) lo cual crea dificultades en la tecnología para la producción de microdietas. Finalmente, la aceptabilidad de las microdietas inertes por las larvas de la

mayoría de las especies marinas comerciales es limitada. Además de que también presentan una baja y/o variable tasa de ingestión en experimentos de alimentación. Sin embargo, la formulación de una dieta compuesta hace posible el estudio de la influencia de nutrientes en el desarrollo de larvas de peces marinos, permitiendo el ajuste de cada nutriente para las necesidades de las larvas (Kolkovski *et al.*, 2004).

#### a) Microdietas

El gran interés de la sustitución de alimento vivo por alimento inerte durante el cultivo de larvas de peces, ha generado la necesidad de obtener una partícula capaz de sustituir eficazmente el alimento vivo, y que se ajuste a las necesidades nutricionales y de comportamiento trófico de las larvas (Yúfera *et al.*, 2000).

El conocimiento en las características de las microdietas, tales como la inclusión de nutrientes bien balanceados, alta estabilidad en el agua (lixiviación de nutrientes), alta digestibilidad y una apropiada suspensión en la columna de agua son aspectos que se deben de tomar en cuenta para su elaboración y fabricación (Yúfera *et al.*, 2000). Sin embargo, lograr simultáneamente todas las características es difícil, por lo que una microdieta completa para larvas de peces marinos, que sea capaz de sostener el crecimiento y sobrevivencia inmediatamente después de la eclosión aún no se ha desarrollado a pesar de los distintos tipos de dietas que se han elaborado (Teshima *et al.*, 2004).

La principal limitante en el uso de dietas microparticuladas es que el tracto digestivo no es completamente funcional en la etapa larvaria, y las larvas son muy débiles (Yúfera *et al.*, 2000), haciendo insuficiente la ingestión y asimilación de los nutrientes administrados (Yúfera *et al.*, 2003).

### **b) Microagregados**

Las partículas microagregadas carecen de una pared como tal y típicamente consiste en una matriz de polímeros en donde los nutrientes son unidos para formar un alimento estable en el agua (Langdon, 2003). Los ligantes utilizados en los microagregados pueden ser de origen proteico o carbohidrático. Los materiales pueden adicionarse alternadamente a las dietas por sus propiedades ligantes específicas, como por ejemplo la zeína, alginato, agar y gelatina (Langdon, 2003). Sin embargo, el tipo de ligante afecta la estabilidad en el agua y por tanto, la lixiviación de nutrientes de la partícula, al igual que la palatabilidad y digestibilidad de la misma (Partridge y Southgate, 1999).

Los microagregados se forman con el empleo de un ligante que gelifica la mezcla, es decir, mezclándolo con los componentes alimenticios (Önal y Langdon, 2000). En donde, la mezcla es pulverizada en bandejas de plástico en capas delgadas. Posteriormente, ésta se seca a temperatura constante alrededor de 50° C y se muele al tamaño de partícula deseado y finalmente almacenada a 6° C hasta su utilización (Nankervis y Southgate, 2006; 2009).

La mayor ventaja de las partículas microagregadas es que son relativamente fáciles y económicas de producir puesto que no involucra el uso de ingredientes potencialmente tóxicos (Langdon, 2003).

Existen otros métodos para la obtención de microagregados como los son: Microextrusión marumerización (MEM), proceso de dos pasos que resulta de productos extruídos en frío (Barrows y Lellis 1996). También se encuentra el método de aglomeración rotacional de partícula asistida (PARA), proceso que utiliza marumerizador, sin extrusión de los ingredientes (Barrows y Lellis, 2006). Y por último, el sistema de aglomeración shere-izer (SAS), proceso similar a MEM, pero trabaja de manera continua y mayor escala y los

ingredientes debes ser previamente pulverizados a  $100\mu\text{m}$  (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004)

### c) Microcápsulas

Uno de los principales objetivos en la aplicación de la técnica de microencapsulación para dietas en acuicultura, es el recubrimiento de los nutrientes con una membrana, para que éstos sean retenidos hasta su liberación por procesos digestivos (Langdon, 2003).

La microencapsulación es una técnica que ofrece la posibilidad de la protección y control de la liberación de los ingredientes en el alimento. Generalmente, estas técnicas pueden ser divididas en tres clases; procesos químicos como la inclusión molecular o polimerización interfacial, técnicas fisicoquímicas como la coacervación y encapsulación de liposomas y procesos físicos como spray-drying, spray/chilling/cooling, co-cristalización extrusión o cubrimiento por fluido (Drusch y Berg, 2008).

Dentro de la gran variedad de métodos para la elaboración de microcápsulas se encuentran, las elaboradas con enlaces cruzados de proteínas, las cuales son una buena herramienta como sustitución de alimento vivo para larvas de peces. Sin embargo, su producción tiene un alto costo y se requieren compuestos potencialmente tóxicos como el ciclohexeno y ácido clorhídrico trimésico para su elaboración (Yúfera *et al.*, 2005). La técnica de microencapsulación mediante polimerización interfacial o gelificación interna con alginato es una buena alternativa para utilizarse en la elaboración de microdietas para larvas de peces. Este proceso se basa en la transformación de una solución gelificada de alginato de sodio en alginato de calcio (Yúfera *et al.*, 2003).



La encapsulación de alginatos se lleva a cabo la mayoría de las veces por la dispersión de alginato como solución encapsulante en un medio gelificante de cloruro de calcio, lo cual induce una polimerización interfacial iónica del alginato uniéndose al calcio dentro de las cavidades de los residuos del azúcar glicorónico, lo que forma una microcápsula polianiónica (Vandenberg *et al.*, 2001).

Las microcápsulas han ganado reconocimiento como vehículos de liberación y transporte de sustancias específicas al sistema digestivo. Los factores que deben considerarse en el diseño de las microcápsulas son el grado de disolución del material envolvente en el sistema de cultivo, aceptación de las cápsulas por las larvas, así como su digestibilidad y costo de producción (Abdulaziz *et al.*, 2008). Uno de los principales pasos en el diseño de encapsulación es la selección de un material apropiado para la pared de las cápsulas, ya que debe facilitar la liberación de sustancias específicas a pesar del corto tiempo de residencia de la dieta en el intestino de la larva (Abdulaziz *et al.*, 2008).

### **1.3 PROBIÓTICOS**

El conocimiento en la aplicación de probióticos en acuicultura es reciente. Sin embargo, su aplicación ha ido en aumento, por considerarse como un tratamiento amigable al ambiente (Gatesoupe, 1999). En acuicultura el término de probiótico es utilizado vagamente para describir una formulación microbiana responsable para la bioremediación y el biocontrol (Vine *et al.*, 2006). Sin embargo, la definición de probióticos se refiere a microbios administradas de alguna forma, para que éstos entren y se mantengan vivos en el tracto gastrointestinal con el propósito de mejorar la salud y de esta forma aumentar la calidad de los peces en cultivo (Gatesoupe, 1999).

Los probióticos se caracterizan por presentar ciertas cualidades como antagonismo a los patógenos; colonización en el intestino con una posible adhesión al mucus intestinal; y aumentar la resistencia del hospedero a patógenos (Vine *et al.*, 2004).

En larvicultivos de peces, los probióticos suelen ser inoculados durante la crianza, incorporándolos en la cadena alimenticia, mediante la administración de éstos al alimento vivo o también por la suplementación de dietas compuestas para peces (Mahious *et al.*, 2006).

**a) Levaduras Marinas**

Las levaduras comerciales son comúnmente utilizadas en acuicultura, ya sean para alimentar al alimento vivo o como ingrediente del algún tipo de alimento. Recientemente, las levaduras vivas han sido propuestas como probióticos por las características que presenta su biología, genética y seguridad (Gatesoupe, 2007). Por otra parte, las levaduras son consideradas por su utilización como probióticos por su habilidad de producir poliaminas, así como también por su capacidad de adherirse y crecer en el mucus intestinal (Tovar-Ramírez *et al.*, 2004).

**b) Debaryomyces hansenii**

*Debaryomyces hansenii* es la levadura mas común que se encuentra en ambientes salinos, como el mar y alimentos salados. Se puede encontrar comúnmente en aguas poco profundas salobres y alcalinas, así como en salmueras y alimentos salados. Por sus características se considera como un microorganismo halotolerante (Pristina *et al.*, 2005). Además es considerada como sujetadora (includer) por su capacidad de acumular altas concentraciones de Na<sup>+</sup> sin

intoxicarse (Prista *et al.*, 2002). El sodio mejora significativamente su crecimiento lo que la convierte en una levadura halofílica (Pristina *et al.*, 2005).

*D. hansenii* Hf1, (cepa 8339) fue aislada del intestino de la trucha arcoiris (*Salmo gairdnerii*) (Andlid *et al.*, 1995) y puede estimular el metabolismo en el mucus intestinal (Waché *et al.*, 2006), además aumenta la sobrevivencia y la conformación vertebral en larvas de peces marinos, así como la maduración del tracto digestivo, incrementando la actividad y expresión de tripsina y lipasa (Tovar *et al.*, 2002).

#### **1.4 DIGESTIBILIDAD**

El conocimiento de la digestibilidad de las dietas es crucial para entender y evaluar la eficiencia de la absorción de nutrientes. De esta forma, el entendimiento de la digestibilidad específica de los ingredientes es importante para brindar elementos que permitan establecer la formulación óptima en las dietas artificiales utilizadas en el cultivo de larvas de peces marinos, ya que el valor nutritivo de un alimento no depende solo de su contenido en nutrientes sino también de la capacidad del animal para digerirlos y absorberlos (Guillaume y Choubert, 2004).

Los actuales modelos de digestibilidad de diferentes fuentes de proteína en peces adultos difieren con respecto a los de las larvas de peces debido a sus diferencias fisiológicas digestivas. Es por ello que se tiene muy poco conocimiento de la digestibilidad de varias fuentes proteínicas utilizadas en dietas compuestas para la primera alimentación en larvas de peces marinos (Tonheim *et al.*, 2007).

a) **Digestibilidad *in vitro***

Los métodos de evaluación *in vitro* han sido utilizados para una evaluación rápida, fácil y reproducible en la alimentación e insumos alimenticios (Alarcón *et al.*, 1996; Alarcón *et al.*, 1999).

La digestibilidad *in vitro* es utilizada para predecir la calidad de los alimentos experimentales y muchos de sus métodos se han desarrollado y probado para medir la digestibilidad de diferentes proteínas en las dietas (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2002); adicionalmente, proveen de una alternativa más apropiada para el desarrollo de una adecuada formulación de alimentos artificiales (Supannapong *et al.*, 2007). En la actualidad el desarrollo del pH-Stat permite una determinación rápida de la digestibilidad de la proteína en diferentes materias primas, utilizando extractos provenientes del tracto gastrointestinal (Alvarez-González, 2003).

El parámetro determinado en los análisis de digestibilidad *in vitro* es el grado de hidrólisis (GH en %) que relaciona los enlaces hidrolizados por las enzimas digestivas con el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína (Alvarez-González, 2003).

## 2. ANTECEDENTES

### *Paralabrax maculatofasciatus*

La cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) pertenece a la familia Serranidae (Nelson, 1994). Estos organismos se caracterizan por presentar un hermafroditismo protogínico simultáneo, además de gonocorismo. Habita sobre fondos arenosos, rocosos o pradera de pastos marinos, desde la costa a unos 60m de profundidad (Fischer *et al.*, 1995). Es una especie de hábito carnívoro que se alimenta durante el día de pequeños peces y crustáceos bentónicos. La cabrilla arenera, es una especie de importancia comercial tanto para pesca deportiva como para consumo humano (Fischer *et al.*, 1995). Esta especie ha sido cultivada a nivel experimental desde 1991. De la cual se ha podido cerrar su ciclo de cultivo, mediante la producción de semillas en el laboratorio (Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui 1996).

### *Lutjanus argentiventris*

El pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) pertenece a la familia Lutjanidae, es una especie demersal cuyos adultos habitan en arrecifes rocosos o coralinos o bien, en cuevas entre rocas. Los juveniles forman pequeñas aglomeraciones en manglares (Fischer *et al.*, 1995). Es una especie carnívora que se alimenta principalmente de peces, crustáceos bentónicos, decapados, cefalópodos y gasterópodos. También se tiene el conocimiento que se alimentan de algas, esponjas, tunicados y gusanos (Vázquez *et al.*, 2008; Santamaría-Miranda *et al.*, 2005). El pargo amarillo es considerado como un recurso pesquero de gran importancia en la costa de Baja California Sur (Vázquez *et al.*, 2008). Además son organismos que presentan una buena resistencia a la manipulación en el cautiverio, lo que lo convierte en una especie con gran potencial para la acuicultura (Serrano-Pinto y Caraveo-Patiño, 1999).

### **Ontogenia digestiva**

Zambonino-Infante y Cahu (2001) describen la ontogenia gastrointestinal en larvas de peces marinos, donde durante las primeras etapas larvales presentan características digestivas particulares, relacionadas a la secreción del páncreas en el que la expresión de la amilasa disminuye con la edad, mientras que otras enzimas como la tripsina, lipasa, fosfolipasa aumentan al llegar a la etapa final del estadio larvario. En trabajos anteriores de Zambonino- Infante y Cahu (1993) y Peres *et al.* (1998) mencionan que la actividad enzimática de tripsina, fosfatasa alcalina y aminopeptidasa se encuentran genéticamente programadas, mientras que la actividad de la amilasa y tripsina se encuentran relacionadas al contenido de sustrato en la dieta administrada al organismo.

### **Microagregados**

Con respecto a los trabajos relacionados con la elaboración y utilización de microagregados en larvas de peces marinos se encuentran Partridge y Southgate (1999) quienes evaluaron la asimilación e ingestión de dietas microagregadas elaboradas con distintos ligantes en larvas de *Lates calcarifer*, los cuales encontraron que los microagregados elaborados con alginato y zeína tuvieron un mayor grado de ingestión. Sin embargo, la eficiencia de asimilación fue baja, mientras que la eficiencia de asimilación de los microagregados elaborados con carragenina y gelatina presentaron una mejor asimilación pero una menor ingestión, además que la concentración del ligante no afectaba la asimilación e ingestión de los microagregados, pero si afectaba la lixiviación de la partícula siendo mayor con menor concentración del ligante. Por otra parte Baskerville-Bridges y Kling (2000) evaluaron características físicas y biológicas de microagregados elaborados con carragenina y microdietas cubiertas con zeína en larvas de *Gadus morhua*, donde las larvas alimentadas con microagregados tuvieron una sobrevivencia del 10% mientras que las alimentadas con alimento vivo tuvieron una sobrevivencia del 35%. Sin

embargo la absorción de las dietas experimentales fue mayor que el alimento vivo.

García-Ortega *et al.* (2000) encontraron que la digestibilidad de la dieta esta relacionada con los materiales de elaboración de los microagregados, ya que la mayor digestibilidad se obtuvo en las larvas alimentadas con microagregados elaborados con un ligante frío como carboxy-methylcellulose a diferencias de los elaborados con carragenina. Langdon (2003) por otro lado menciona que el tipo de ligante afecta la estabilidad de la partícula y lixiviación de los nutrientes, así como la palatabilidad y digestibilidad de los microagregados.

Teshima *et al.* (2004) administraron microagregados de zeína con diferentes fuentes proteicas en larvas de *Paralichthys olivaceus* y *Pargus major*, donde los organismos alimentados únicamente con microagregados presentaron una longitud total y ganancia en peso menor que los peces alimentados con alimento vivo y combinación de alimento vivo con microagregados.

Önal y Langdon (2005) compararon el desempeño en la liberación de glicina y una mezcla de aminoácidos libres (alanina, glicina, leucina, serina y tirosina) en larvas de pez con partículas complejas, gotas en spray de lípidos y microagregados de zeína. Las partículas complejas y los microagregados de zeína tuvieron una mayor retención y eficiencia de liberación, sin embargo a diferencia de los microagregados las partículas complejas presentaron una mayor aceptación por las larvas.

### **Microcápsulas**

Khemis *et al.* (2000) utilizaron dietas microencapsuladas en larvas de *Pseudopleuronectes americanus* para el reemplazo de alimento vivo, las cuales fueron incapaces de digerirlas, mientras que Chu y Ozkizilcik (1999)

encontraron que la digestibilidad de las microcápsulas de caseína mejora con extracto de *Artemia* en larvas de *Morone saxatilis*. Por otra parte Yufera *et al.* (2000) probaron la microencapsulación por gelificación interna con alginato como microdieta en larvas de *Solea senegalensis* y *Sparus aurata*, demostrando que ambas especies presentaron un buen crecimiento y desarrollo. Yúfera *et al.* (2003) utilizaron la misma técnica de encapsulación para la liberación de diferentes componentes (vitaminas, hormonas y aminoácidos) cuya eficiencia de inclusión fue baja, sin embargo encontraron que las microcápsulas retenían y liberaban las sustancias hasta el tracto digestivo en larvas de *S. senegalensis* y *S. aurata*. García-Gómez (2006) utilizó dos tipos de microcápsulas como reemplazo alimenticio con distintas fuentes proteicas en larvas de *P. maculatofasciatus* cuya sobrevivencia y actividad enzimática fue menor que las alimentadas con alimento vivo. Mientras tanto Olalde-Rodríguez (2005), probó microcápsulas con tres concentraciones distintas de espermina (0, 0.1 y 0.3%) en larvas de *P. maculatofasciatus* encontrando un aumento en la expresión de amilasa e inmunoglobulina (IgM).

### **Probióticos**

Vine *et al.* (2006) mencionan que la administración de probióticos a larvas de peces puede proveer a su hospedero de enzimas digestivas, aumentando también la capacidad del sistema digestivo. Se ha probado también la digestibilidad *in vitro* con bacterias aisladas de los sistemas digestivos de peces, las cuales demostraron la capacidad de digerir, quitina, almidón, proteína, celulosa y lípidos (Vine *et al.*, 2006). Sin embargo, este mismo autor menciona que el criterio de selección de probióticos en larvas difiere de los criterios utilizados en peces adultos, principalmente porque el sistema digestivo en larvas tiene un pH alcalino.



Waché *et al.* (2006) utilizaron como ligante aceite de hígado de bacalao para la incorporación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *S. cerevisiae* var. *boulardi* en distintas dietas para comparar los efectos probióticos de ambas cepas de levadura en larvas de trucha arcoíris, habiendo mayor maduración intestinal en los organismos alimentados con la levadura *S. cerevisiae* var. *boulardi*.

Gatesoupe (2007) menciona que las levaduras contribuyen significativamente a la microflora gastrointestinal en peces sanos, siendo en algunos casos más numerosas que bacterias. En trabajos relacionados con los efectos de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* como probióticos son los de Tovar *et al.* (2002) en donde la adhesión de ambas cepas al tracto digestivo de larvas de lubina europea no fue significativamente diferente. Sin embargo, la producción de poliaminas de *D. hansenii*, provee una aceleración de la maduración del tracto digestivo, una mayor sobrevivencia y un aumento de la actividad enzimática de lipasa y tripsina en larvas de lubina europea y de la cabrilla arenera, a una concentración de 1.1% (Gúzman Villanueva, 2008).

En otros estudios relacionados con la utilización de levaduras como suplemento en larvas destetadas se encuentra el de Barnes *et al.* (2006) quienes determinaron el efecto de la levadura seca como suplemento en cultivos de la trucha McConaughy, alimentadas con tres dietas, con distintos niveles de inclusión de levaduras (0, 0.125 g/kg y 0.25 g/kg). Cuya sobrevivencia y crecimiento durante la primera alimentación fueron atribuidos a las características inmunoestimulantes de las levaduras. También se llevaron a cabo estudios relacionados con el efecto de la incorporación de levaduras vivas en alimentos microparticulados sobre la respuesta inmune y actividad enzimática digestiva, así como antioxidante en juveniles de cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) (Reyes *et al.*, 2008; Linares Aranda, 2007) y cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (Gúzman Villanueva, 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El objetivo fundamental de la acuicultura es la producción máxima por unidad de espacio y de esfuerzo, así como la obtención de productos marinos de buena calidad. En el caso de la crianza larvaria de peces marinos, el costo de producción de alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) representa un 20-25% del total (Barnabé, 1996). En este sentido, es importante reemplazar el alimento vivo por inerte a los pocos días de la eclosión para el abatimiento de costos. Sin embargo, dicho remplazo del alimento se asocia con mortalidades masivas larvarias debido a factores físicos y bioquímicos (Cahu y Zambonino Infante, 2001). Por ejemplo, el reducido tamaño de la apertura bucal de las larvas requiere un tamaño de partícula de alimento lo suficientemente pequeño para que pueda ser ingerido (~ 50 – 150  $\mu\text{m}$ ) (Conceição, 2007). Además, la ausencia de un tracto digestivo maduro en las larvas dificulta la asimilación de los nutrientes.

En dicho contexto, resulta importante profundizar en el desarrollo de tecnologías más eficaces para la inclusión de probióticos (e.g. levaduras) en microdietas que favorezcan la maduración gastrointestinal larvaria y la absorción de nutrientes (Tovar *et al.*, 2004). Para lograr avances significativos en este rubro, con este trabajo pretendemos contribuir en el desarrollo de una tecnología para la inclusión de un probiótico, en este caso la levadura marina *D. hansenii*, en microdietas (microcápsulas y microagregados) diseñadas para la etapa larvaria de *P. maculatofascaitus* y *L. argentiventris*. Para obtener microdietas específicas, es necesario evaluar si los extractos de tracto digestivo de estas especies tienen, la capacidad de hidrolizar los materiales de elaboración de dichas microdietas para asegurar una adecuada liberación del probiótico y los nutrientes.

#### 4. HIPÓTESIS

- La levadura marina *D. hansenii* podrá ser encapsulada mediante el proceso de gelificación interna y conservará su viabilidad, lo que permitirá su posterior utilización como probiótico en la alimentación de larvas de peces marinos.
  
- El alginato de sodio y el aceite de hígado de bacalao permitirán la inclusión de la levadura marina *D. hansenii* viva en microdietas diseñadas para la etapa larvaria de peces marinos.
  
- Las microcápsulas y los microagregados suplementados con la levadura marina *D. hansenii* serán hidrolizados por los extractos del tracto digestivo de la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*) y el pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*).

## 5. OBJETIVO GENERAL

Elaborar microdietas suplementadas con la levadura marina *D. hansenii* para ser administrada en las etapas larvarias de *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

6.1 Elaborar microcápsulas que contengan la levadura marina *D. hansenii*, mediante el proceso de gelificación interna.

6.2 Evaluar el alginato de sodio y aceite de pescado como ligantes superficiales para la incorporación de la levadura marina *D. hansenii* como probiótico en dietas microagregadas.

6.3 Conocer la capacidad de hidrólisis de los extractos digestivos de *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris* sobre los ligantes (alginato y aceite de pescado) utilizados para la inclusión de la levadura en los microagregados.

6.4 Determinar la digestibilidad *in vitro* de las microcápsulas y microagregados suplementados con levaduras, utilizando extractos del tracto digestivo de *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Producción de biomasa de levadura *D. hansenii*

Se utilizó levadura *D. hansenii* cepa CBS 8339 cultivada en medio líquido YPD (Yeast extract - Dextrose broth, Sherman, 1991) compuesto de extracto de levadura 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, glucosa 20 L<sup>-1</sup>, adicionado con cloranfenicol 1 mg/mL. La incubación se llevó a cabo en agitación a una velocidad de 120 rpm a una temperatura de 30° C durante 24 hrs en 20 L. Posteriormente la cosecha de las células se llevó a cabo mediante centrifugación de flujo continuo en una centrífuga Beckman J2-HS, rotor JCF-Z a 5000 rpm a 10° C con ayuda de una bomba peristáltica Manostat. Para la obtención del sedimento de levadura se volvió a centrifugar a 5000 durante 15 minutos en una centrífuga Eppendorf Centrifuge con un rotor 5810 R. Una vez obtenidos los cultivos de *D. hansenii* se realizó la evaluación de viabilidad y cuantificación de UFC/g de levadura con ayuda de medio agar/YPD, a una dilución de 10<sup>6</sup> y a una temperatura de 30° C. Los sedimentos fueron almacenados a 4° C hasta su utilización.

### 7.2 ENCAPSULACIÓN DE LEVADURA *D. hansenii* CON ALGINATO DE SODIO

#### 7.2.1 Evaluación inicial de la proporción más adecuada de alginato para la encapsulación

Se realizaron pruebas de pulverización con tres concentraciones diferentes de alginato de sodio (1.5%, 2% y 3%). Las diferentes mezclas se pulverizaron con ayuda de un aerógrafo de acción doble conectado a un equipo de compresión de aire con una salida de 2 bares de presión. La pulverización se llevó a cabo sobre una charola de plástico con cloruro de calcio anhidro al 2%, como agente

gelificante, a una temperatura de 4° C, en agitación para evitar el aglomeramiento entre las microcápsulas.

### **7.2.2 Evaluación visual de la inclusión efectiva de las levaduras en las microcápsulas**

Se suspendieron 0.23 g de levadura *D. hansenii* en 100 mL de agua MiliQ; de la suspensión se tomaron 3 mL, los cuales fueron teñidos con 5 µL de rojo neutro como colorante. Una vez teñidas las células de levadura se procedió a lavarlas con solución salina de fosfatos (PBS) tres veces para eliminar el resto de colorante en la suspensión. Finalmente se mezclaron 2.5 mL de levadura teñida con 10 mL de alginato de sodio al 2% para la elaboración de microcápsulas siguiendo la metodología previamente descrita.

### **7.2.3 Evaluación de la viabilidad y cuantificación de UFC/g de microcápsulas frescas tras el proceso de encapsulación**

La evaluación de la viabilidad de la levadura fresca tras el proceso de encapsulación se llevó a cabo tomando dos muestras de 100 µL de microcápsulas recién elaboradas. Una de las muestras fue resuspendida en 1000 µL de agua destilada, mientras que la otra muestra fue resuspendida en 500 µL de bicarbonato de sodio al 4% y 500 µL de agua destilada para disolver el alginato de las microcápsulas. Posteriormente ambas muestras fueron sembradas por triplicado en medio agar/YPD para observar la viabilidad y la cuantificación de UFC/g de microcápsulas. Con este dato se estimó la concentración de la inclusión de levadura por gramo de alginato de sodio.

#### **7.2.4 Evaluación de la viabilidad y cuantificación de UFC de levadura *D. hansenii* sometida al proceso de liofilización**

Los sedimentos de levadura obtenidos del punto 7.1 fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 hrs (previamente se tomó una muestra para contabilizar las UFC de levadura/g de peso fresco en agar/YPD). Posteriormente los sedimentos celulares fueron colocados en una liofilizadora Telstar y se dejaron durante 24 hrs. Una vez obtenidas las células liofilizadas se pesó y se tomó una muestra, para nuevamente contabilizar las UFC de levadura/g de liofilizado.

#### **7.2.5 Inclusión definitiva de levadura liofilizada en microcápsulas**

Una vez obtenidos UFC de levadura *D. hansenii*/g de liofilizado, se realizaron los cálculos para saber los gramos de levadura liofilizada para incluir en 50 mL de alginato de sodio al 2% para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/g de microcápsulas.

#### **7.2.6 Preparación de microcápsulas enriquecidas con hidrolizado de calamar como agente attractante.**

Se prepararon 500 mL de la solución de alginato de sodio al 2%, la cual fue mezclada con 10 g de levadura liofilizada y 2 g de hidrolizado de calamar a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Una vez que se obtuvieron las micropartículas según el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1, se separaron por tamaño con ayuda de un tamiz de  $100\ \mu\text{m}$  recuperando las micropartículas menores a  $100\ \mu\text{m}$  de diámetro. Posteriormente se procedió a lavarlas con agua destilada estéril para evitar la contaminación con otros microorganismos. Finalmente una vez lavadas se procedió a liofilizar las microcápsulas como método de preservación

y se realizó una prueba de viabilidad y cuantificación de UFC de levaduras/g de microcápsulas lavadas y liofilizadas.

El propósito de adicionar el hidrolizado de calamar, fue para hacer atractivos las microcápsulas para las larvas de peces al momento de la alimentación.

#### **7.2.7 Obtención de micrografías de las microcápsulas con microscopio electrónico de barrido**

Se realizaron micrografías de las microcápsulas con levadura en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N, para observar la inclusión efectiva de las levaduras, así como el tamaño y estructura tridimensional de las mismas. Inicialmente la muestra de 0.2 mg de microcápsulas fue recubierta con plata para facilitar la conducción de electricidad por medio de un Sputter Coater Denton Vacuum Desk II. Posteriormente la muestra se observó en el microscopio electrónico de barrido, para la obtención de las micrografías. Dichas micrografías se obtuvieron con ayuda del técnico de laboratorio Ariel Alberto Cruz Villacorta, encargado del laboratorio de microscopía electrónica en el CIBNOR.



### 7.3 ELABORACIÓN DE DIETA MICROPARTICULADA

La elaboración de la dieta microparticulada se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Acuícola perteneciente a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de acuerdo a la formulación utilizada por Guzmán-Villanueva, 2008.

Tabla I. Formulación utilizada para la fabricación de las dieta microparticulada

INGREDIENTE ALIMENTO CONTROL	(%) BASE HÚMEDA
Harina de Sardina <sup>a</sup>	21.56
Gluten de Trigo <sup>c</sup>	15.0
Conc. Prot. Sol. Pescado <sup>a</sup>	20.0
Harina de Calamar <sup>d</sup>	15.0
Harina Integral de Trigo <sup>a</sup>	14.07
Aceite de Hígado de Bacalao <sup>d</sup>	5.09
Lectina de Soya <sup>b</sup>	4.87
Alginato de Sodio (SIGMA-W201502)	2.0
L-Lisina HCL (SIGMA-L5501)	0.50
L-arginina HCL (SIGMA-A7965)	0.50
Premezcla de vitaminas <sup>f</sup>	0.70
Premezcla de minerales <sup>g</sup>	0.50
Cloruro de Colina (SIGMA-C1870)	0.13
Vitamina C <sup>f</sup>	0.08
Butil Hidroxi Tolueno (BHT) (SIGMA-B1378)	0.002

<sup>a</sup> PIASA, La Paz, Baja California Sur, México; <sup>b</sup> ODANAJI. Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C.V. México. <sup>c</sup> PROBST S.A. de C.V. <sup>d</sup> harina de calamar y proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. <sup>e</sup> Drogería Cosmopolita S.A. de C.V. <sup>f</sup> Premezcla de vitaminas (mg/Kg de dieta): Vit. A (retinol), 0.6 (ICN); Vit. D3 (colecalfiferol), 0.0042 (SIGMA); Vit. E (tocoferol), 35 (SIGMA); Vit. K (menadiona), 7 (SIGMA); Vit. B1 (tiamina), 0.7 (SIGMA); Vit. B2 (riboflavina), 2.8 (SIGMA); Vit. B6 (piridoxina), 2.1 (SIGMA); Ácido pentanoico, 14 (SIGMA); Niacina (ácido nicotínico), 7 (SIGMA); Biotina, 0.112 (ICN); Inositol, 210 (SIGMA); Vit. B12 (cianocobalamina), 0.014 (SIGMA); Ácido fólico, 0.7 (SIGMA); Vehículo harina de sorgo. <sup>g</sup> Premezcla de minerales (g/kg de dieta; SIGMA): CaCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.57; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.72; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.49; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.18; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.028; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0096; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0025; KI, 0.0003 mg; SeS<sub>2</sub>, 0.42 mg. <sup>h</sup>ROVIMIX-ROCHE.

El alimento fue elaborado con las harinas previamente pulverizadas y tamizadas a 40µm a excepción del concentrado proteico soluble de pescado con ayuda de un pulverizador automático. Una vez pulverizadas se procedió a la elaboración de la mezcla de los macroingredientes (harina de sardina, gluten de

trigo, concentrado proteico de solubles de pescado, harina de calamar y harina de trigo) en una mezcladora vertical (Kitchen Aid) a baja velocidad, durante 10 minutos. Por otra parte se elaboró la mezcla de los microingredientes (L-lisina-HCl, L-arginina, cloruro de colina, alginato de sodio, premezcla de vitaminas y minerales y vitamina C), una vez mezclados los microingredientes fueron adicionados a la mezcla de macroingredientes y se mezclaron durante 10 minutos. Por otro lado, se realizó una emulsión de la mezcla lipídica (aceite de hígado de bacalao, lecitina de soya y BHT). Una vez emulsionada la mezcla lipídica se agregó a la mezcla anterior y se mezcló durante 5 minutos. Se le adicionaron 450 mL de agua y se mezcló durante 3 minutos.

Posteriormente la mezcla se pasó lentamente dos veces por un molino de carne TORREY con un dado de 1/8 de diámetro. A la segunda vez que se pasó los pellets fueron cortados aproximadamente de 1 cm de largo. Una vez cortado el alimento fue colocado en una charola e inmediatamente después se puso a secar en un horno a 30° C durante 24 hrs. Finalmente el alimento fue molido con ayuda de un molino de café (BRAUN, modelo K2M2), posteriormente fue tamizado con un tamiz con luz de malla de 102  $\mu\text{m}$  de diámetro, para la obtención de una partícula de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de tamaño se tamizó también con un tamiz de luz de malla de 50  $\mu\text{m}$ .

#### **7.4 ELABORACIÓN DE MICROAGREGADOS CON INCLUSIÓN DE LEVADURA VIVA *D. hansenii***

Para la elaboración de los alimentos microagregados se utilizaron dos fuentes distintas de dietas microparticuladas. Una elaborada en el Laboratorio de Nutrición Acuícola en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) con la formulación utilizada por Guzmán-

Villanueva, 2008 (Tabla I) y una dieta comercial BERNAQUA® tipo caviar con un tamaño de partícula entre 50 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, diseñada para la alimentación de larvas de peces

Tabla II. Ingredientes del alimento comercial BERNAQUA® tipo caviar (50-100 $\mu\text{m}$ )

INGREDIENTES
Proteínas de alta calidad de pez y otras proteínas marinas
Proteínas de leche
Aceite refinado de pescado
Fosfolípidos
Astaxantina
Levadura
Extracto de levadura
Substancias inmuno-modulantes
Vitaminas
Minerales quelados
Anti-oxidantes

Tabla III. Composición químico proximal del alimento comercial BERNAQUA® tipo caviar (50-100 $\mu\text{m}$ ) reportada por el fabricante.

	BASE SECA (%)
Humedad	8
Proteína Cruda	50
Extracto Etéreo	15
Fibra Cruda	2
Cenizas	20
Calcio	2
Fosforo	1.5

Se elaboraron 4 dietas de microagregadas en donde se utilizaron aceite de hígado de bacalao y alginato de sodio al 2%, como ligantes de las levaduras a las micropartículas de alimento. Dos de ellas se elaboraron con el alimento comercial (BERNAQUA) y las otras dos con el alimento elaborado en el CIBNOR.

Se realizaron dos mezclas distintas para cada uno de los ligantes. La mezcla utilizada para la aspersión de alginato como ligante, se elaboró mezclando 22 mL de alginato de sodio al 2% con 3 g de una suspensión de microcápsulas de levadura *D. hansenii* para tener una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/g de dieta microagregada.

Para el caso de la mezcla utilizada para la aspersión de aceite de hígado de bacalao como ligante, se mezclaron 22 mL de aceite de hígado de bacalao con 3 g de levadura, para obtener una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/g de dieta microparticulada.

La aplicación de las mezclas (aceite-levadura y alginato-levadura) se realizó mediante aspersión de los alimentos microparticulados (CIBNOR y BERNAQUA), con ayuda de un aspersor cosmético. Por cada 10 disparos efectuados con el aspersor (1.2 mL de la mezcla) equivalían a 3 g de alimento. Posteriormente se dejaron secar los alimentos a 30° C y se muestrearon 0.1 g de cada alimento para verificar la viabilidad de las levaduras contando la unidades formadoras de colonias (UFC/g de microdieta) en placas de medio YPD con agar. Para diferenciar los cuatro tipos de microagregados fueron nombrados como sigue: microagregados de alimento experimental (CIBNOR) con inclusión de levadura con alginato de sodio (MFAL), microagregados de alimento experimental con inclusión de levadura con aceite de hígado de bacalao (MFAC), microagregados de alimento comercial BERNAQUA e inclusión de levadura con alginato de sodio (MBAL) y microagregados de alimento comercial BERNAQUA e inclusión de levadura con aceite de hígado de bacalao (MBAC).

#### **7.4.1 Micrografías de microdietas**

Se obtuvieron micrografías de todas las microdietas para observar cambios físicos (tamaño y apariencia) entre las microdietas sin la inclusión de levadura con respecto a las microdietas suplementadas con levadura. Dichas micrografías fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido como se mencionó en el apartado 7.2.7.

### **7.5 DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE LAS MICRODIETAS UTILIZANDO EXTRACTOS DIGESTIVOS DE CABRILLA ARENERA (*P. maculatofasciatus*) Y PARGO AMARILLO (*L. argentiventris*).**

#### **7.5.1 Obtención de extractos**

Los juveniles de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*) fueron obtenidos del medio silvestre y donados por el Dr. Martín Oscar Rosales Velázquez (CICIMAR), mientras que los juveniles de pargo amarillo (*L. argentiventris*) fueron cultivados en las instalaciones del CIBNOR, y donados por el Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola.

Los extractos fueron obtenidos de 12 juveniles en ayuno de 12 hrs de cabrilla arenera y 23 juveniles de pargo amarillo cuyo peso promedio fue 9.5g y 2.0g, respectivamente. Los peces fueron sacrificados mediante shock térmico en agua de mar con hielo, para preservar la actividad de las enzimas. La disección de los organismos se realizó sobre hielo y se extrajeron los tractos digestivos completos (estómago, páncreas, ciegos pilóricos e intestinos). Posteriormente se maceraron las muestras con ayuda de un disruptor (Politron, Pro-scientific Inc) con 4 volúmenes en agua destilada por gramo de muestra. Finalmente los extractos se centrifugaron a 14000 rpm con una centrífuga Eppendorf con un

rotor 5804 R por 15 minutos a 5° C, recuperando la fase líquida y almacenándola en alícuotas de 1 mL a -80° C hasta su utilización.

### 7.5.2 Determinación de proteína soluble (Bradford, 1976)

La determinación de la concentración de proteína soluble se realizó con 8 µL del extracto problema al cual se le añadió 792 µL de agua destilada y 200 µL del reactivo de Bradford. Posteriormente se agitó en vortex y finalmente la densidad óptica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro. Todas las medidas se hicieron por triplicado con un blanco (agua destilada). Para el cálculo de la concentración proteica soluble en los extractos se utilizó una curva estándar de albúmina bovina (Sigma).

### 7.5.3 Métodos para la determinación de actividad enzimática específica.

Para la cuantificación de la actividad específica enzimática de los extractos digestivos tanto de cabrilla arenera como de pargo amarillo, se realizaron los métodos descritos a continuación; todos los métodos se realizaron por triplicado, incluyendo testigos y un blanco. La actividad de los extractos se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$Unidad / ml = \frac{\Delta abs \times volumen\ final_{reaccion} (ml)}{CEM \times tiempo(min) \times volumen\ extracto(ml)}$$

Siendo:

$\Delta abs$  el incremento de absorbencia a una determinada longitud de onda;  $volumen\ final_{reaccion}$  el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado en la recta de regresión ( $ml \times mg^{-1} \times cm^{-1}$ )

La actividad específica se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Unidades/ mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades/ ml}}{\text{mg proteína soluble/ ml}}$$

#### 7.5.3.1 Pepsina o proteasa ácida (Anson, 1983)

Se utilizó la técnica de Anson (1983), con las siguientes modificaciones: a 1 mL de hemoglobina (0.5%) en amortiguador 0.1 M glicina-HCl a pH 2.0 se le añadieron 20  $\mu$ L de extracto enzimático. El extracto se incubó durante 30 minutos a 37° C y la reacción se detuvo por adición de 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Después se dejó reposar la mezcla de reacción (15 a 30 minutos) a 4° C, se centrifugó a 12000 rpm con una centrífuga Eppendorf rotor 5804 R durante 5 minutos. En el sobrenadante, se midió la cantidad de tirosina liberada ( $ABS_{280 \text{ nm}}$ ) mediante un espectrofotómetro uv/visible. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 $\mu$ g equivalente de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó una recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (de 0 a 300  $\mu$ g/mL).

#### 7.5.3.2 Actividad de proteasa (Divakaran y Ostrowski, 1990)

La determinación de la actividad de la proteasa se realizó para conocer las unidades de enzima presentes por miligramo de proteína en los extractos, para determinar el volumen requerido para los estudios de digestibilidad *in vitro* de proteína en pH-STAT. Se utilizó azocaseína como sustrato (2% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5). La mezcla de reacción se formuló con 230  $\mu$ L de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 20  $\mu$ L de extracto enzimático problema y finalmente 500  $\mu$ L de azocaseína para iniciar la reacción, se agitó y se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la reacción se detuvo con 500  $\mu$ L de TCA

al 20%, se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga Eppendorf rotor 5804 R durante 5 minutos y se leyó el sobrenadante a 440nm de absorbancia. Los testigos se realizaron de la misma forma, la diferencia radicó en que el extracto se adicionó una vez detenida la reacción con el TCA. Una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 $\mu$ g de tirosina por minuto.

#### **7.5.3.3 Actividad tripsina (Erlanger *et al.*, 1961)**

Se preparó una solución 100 mM de N $\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida (BAPNA) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó a 100 mL usando amortiguador 50 mM de Tris-HCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 8.2. Para iniciar la reacción se mezcló 1.25 mL de sustrato (a 37° C) con 20  $\mu$ L del extracto enzimático. Después de un tiempo de incubación de 15 minutos, con velocidad de hidrólisis lineal, la reacción se detuvo con la adición de 0.25 ml de ácido acético al 30%. A continuación, se midió la absorbancia a 410 nm utilizando testigos, en donde el extracto se agregó una vez detenida la reacción con ácido acético. La unidad de actividad se definió como 1 $\mu$ mol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8800 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>.

#### **7.5.3.4 Actividad lipasa (Versaw *et al.*, 1989)**

El método se inició con 100  $\mu$ L de taurocolato de sodio (100 mM) y a 1.9 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7.2) se le agregaron 20  $\mu$ L de extracto enzimático, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se inició la reacción con 20  $\mu$ L de  $\beta$ -naftil caprilato (200 mM) por 30 minutos a 37° C. Posteriormente se le agregaron 20  $\mu$ L de Fast Blue BB (100 mM) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se detuvo la reacción con 200  $\mu$ L de TCA (0.72 N), y se clarificó con 2.71 mL de etanol acetato de etilo (1:1 v/v). Se agitó en



el vortex y se leyó la absorbancia a 540 nm en celdas de vidrio o cuarzo. La unidad de lipasa se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 540nm por minuto, en donde la actividad específica se representó como las unidades de enzima por miligramo de proteína.

#### **7.5.3.5 Actividad amilasa (Vega-Villasante *et al.*, 1993)**

La actividad  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$  1-4 glucán 4-glucanhidrolasa) de los extractos se valoró incubando a 37° C de la siguiente manera: 10  $\mu$ L de extracto con 500  $\mu$ L de almidón soluble 1% (p/v) en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se le agregaron 200  $\mu$ L de carbonato de sodio (2 N) para parar la reacción y 1.5ml de DNS (ácido dinitrosalicílico) para la cuantificación de los azúcares libres reductores. Posteriormente la mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos en baño María, en ebullición, después se diluyó la mezcla con 7.3 mL de agua destilada. Finalmente se midió la absorbancia a 550 nm. Se definió una unidad de actividad amilasa como Unidades (absorbancia 550nm/min)/mg de proteína. Los cambios de absorbancia, son producto de la cantidad de azúcares reductores liberados por la hidrólisis del almidón por la  $\alpha$ -amilasa.

## **7.6 DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE LAS MICRODIETAS**

### **7.6.1 Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos**

La digestibilidad *in vitro* de los polisacáridos se realizó basándose en los métodos de Vega Villasante *et al.* (1993) y Nolasco (2006), con las siguientes modificaciones; el extracto enzimático tanto de la cabrilla arenera (*P.*

*maculatofasciatus*), como el de pargo amarillo (*L. argentiventris*) se incluyeron a una concentración de 0.0154 U de amilasa/mg de alimento para cada reacción. Como sustrato se utilizó cada uno de los alimentos al 1% en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Se manejaron 4 tiempos de incubación a temperatura ambiente de 10, 30, 60 y 180 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de digestión se siguió el protocolo descrito previamente (punto 7.5.3.5) para medir azúcares reductores libres, a excepción de la dilución de la mezcla de reacción, con agua destilada. La actividad se refirió como actividad carbohidrolasa total/mg de proteína, como reflejo de la hidrólisis de los alimentos por estas enzimas.

Se adicionaron las Unidades de amilasa arriba mencionadas, debido a que en estudios anteriores (Guzman-Villanueva, 2008) las larvas de cabrilla presentaron una actividad específica de 0.0154 U de amilasa/mg de proteína soluble.

### **7.6.2 Digestibilidad *in vitro* de proteínas**

La digestibilidad *in vitro* de las proteínas por la proteasa ácida se realizó por método de punto final (Anson, 1983) con las siguientes modificaciones: los extractos enzimáticos tanto de cabrilla arenera y pargo amarillo se ajustaron a una concentración de 5 Unidades de proteasa ácida/mL de mezcla reacción, simulando la actividad específica de proteasa ácida presente en larvas de cabrilla arenera de 15 DDE (Alvarez-González, 2003). Como sustrato se utilizaron cada uno de los alimentos al 1% en amortiguador de glicina 0.1 M, pH 2.0. Se manejaron 4 tiempos de incubación a temperatura ambiente de 10, 30, 60 y 180 minutos. Después del tiempo de incubación se siguió el protocolo descrito previamente (punto 7.5.3.1).

### 7.6.3 Digestibilidad *in vitro* de proteínas mediante pH-Stat (Ezquerro *et al.*, 1998)

Como los alimentos contaban con un tamaño de partícula entre los 50 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro no hubo necesidad de moler el alimento para la mezcla de reacción. Además se realizaron las siguientes modificaciones al método para la mezcla; se utilizó 1 g (con contenido de proteína cercano al 50%) para cada alimento problema. Se ajustó el pH de la mezcla a 8 y se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático equivalente a 1.054 U de proteasa/10mL de mezcla de reacción. Se mantuvo la incubación durante 1800 segundos en agitación a temperatura ambiente. Durante el tiempo de incubación se fue registrando el consumo de NaOH, cada 300 segundos, para construir una curva del consumo de NaOH por unidad de tiempo. Para cada muestra se utilizó un testigo con el extracto enzimático inactivado (20 minutos en baño María en ebullición). La digestibilidad se expresó de acuerdo a la siguiente ecuación;

$$D = \frac{\text{Consumo de NaOH/minuto por hidrólisis de la muestra problema} - \text{Consumo de NaOH/ minutos por hidrólisis del testigo}}{\text{Consumo de NaOH/minuto por hidrólisis de la muestra problema}}$$

La digestibilidad relativa se puede expresar con la siguiente fórmula:

$$DR = \frac{\text{Consumo de NaOH/minuto por hidrólisis de la muestra problema}}{\text{Consumo de NaOH/ minutos por hidrólisis de la proteína de referencia}} \times 100$$

El grado de hidrólisis de los alimentos, se tomó como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados, mediante espectrofotometría a 280 nm, en donde las microdietas sin inclusión de levadura (microparticulados

experimental y BERNAQUA) se compararon con los microagregados con la formulación experimental y microagregados BERNAQUA respectivamente.

#### 7.6.4 Digestibilidad *in vitro* de lípidos (Nolasco, 2006)

Únicamente se midió la digestibilidad del aceite de hígado de bacalao, ingrediente utilizado como ligante en la elaboración de los microagregados, por los extractos de cabrilla arenera y pargo amarillo. Para la reacción se preparó una emulsión con 95 mL de agua destilada, 5 g de goma arábica, 4 g de aceite de hígado de bacalao, los cuales fueron homogenizados en una licuadora por 10 minutos. Para la determinación de la digestibilidad, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 7 mL taurocolato de sodio (20 mM), 5 mL de la emulsión de aceite, 2 mL de NaCl (1 mM), 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (20 mM) y se homogeneizaron por sonicación (20 W, 20 segundos). Posteriormente la mezcla fue ajustada a pH 8 y se le agregaron 100 µL de extracto cabrilla arenera ó 350 µL de extracto de pargo amarillo con una equivalencia de 10 U de lipasa. Finalmente la mezcla se dejó incubando 1800 segundos a 25 °C en agitación. Cada 300 segundos se registró el consumo de NaOH, con la que se construyó una curva de consumo por unidad de tiempo. Se calculó la ecuación de la curva y la pendiente de la misma (consumo de NaOH/segundo), también se calculó el NaOH/min. La velocidad de hidrólisis o digestibilidad (Moles de NaOH/min) se calculó con:

#### **Velocidad de hidrólisis (Digestibilidad):**

$$VH = \frac{(P-T) \times [NaOH]}{Vol. Enzima \times Conc. de proteína} \times 1000$$

P = Consumo de NaOH por hidrólisis del sustrato (mL/min).

T = Consumo de NaOH del testigo (mL/min).

[NaOH] = concentración de NaOH (Molaridad)

Vol. enzima = volumen de la enzima (mL)

Conc. Proteína = Conc. de proteína de la solución enzimática (mg/mL)

1000: Factor de conversión a µmoles de NaOH

### 7.7 Análisis Estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos de la digestibilidad *in vitro* de las dietas con diferentes tipos de inclusión de levadura *D. hansenii* con extractos digestivos de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*) y pargo amarillo (*L. argentiventris*) por separado, con un mínimo de 3 réplicas en cada ensayo. Se les realizaron pruebas de normalidad y homoscedasticidad y al no cumplir con dichos postulados se aplicaron las pruebas de Kruskal-Wallis para encontrar las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las microdietas y U de Mann-Whitney para las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el tiempo de incubación para cada microdieta. Para el análisis de las pruebas estadísticas se utilizó el programa estadístico STATISTICA v 6.0.

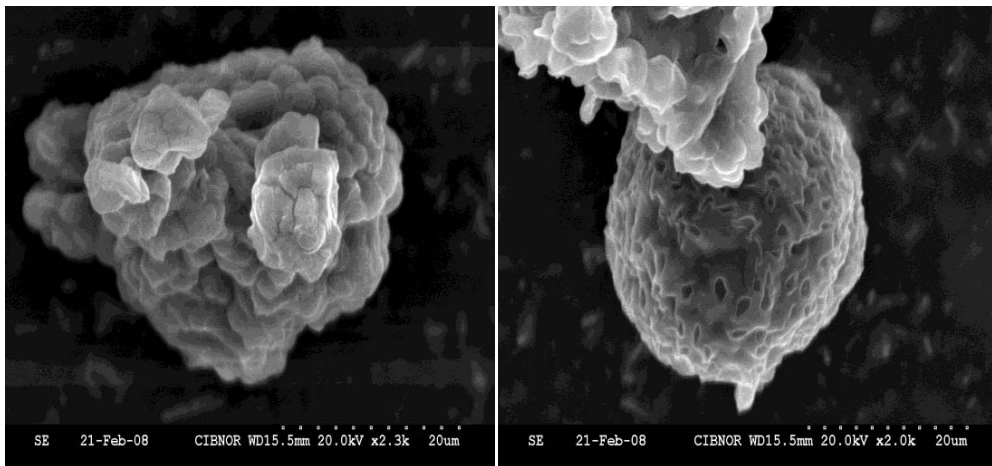
## 8. RESULTADOS

### 8.1 Elaboración de microcápsulas con alginato de sodio

La concentración de 2% de alginato fue la más adecuada para conseguir microcápsulas homogéneas de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dicha concentración de alginato de sodio permite una mayor facilidad de manejo al momento de espolvorearlo.

### 8.2 Inclusión de levadura marina (*D. hansenii*) en las microcápsulas

La microencapsulación de las levaduras se realizó de forma satisfactoria, obteniendo microcápsulas de alginato de sodio al 2%, y una recuperación de  $1.16 \times 10^6$  UFC por gramo de microcápsulas (Fig. 1A). También se logró obtener un tamaño de partícula menor a las 50  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 1B).

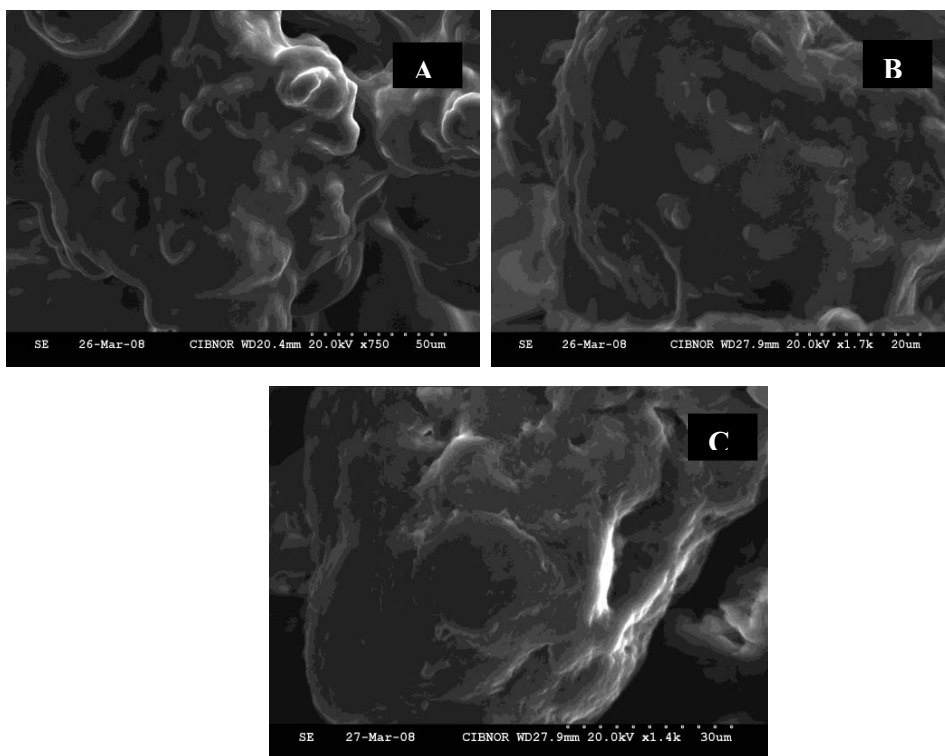


**Figura 1.**

Micrografía electrónica de barrido de microcápsulas de alginato con inclusión de levadura *D. hansenii* a un aumento de a una concentración de  $1.16 \times 10^6$  UFC menores de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro a un aumento de 2.0K x.

### 8.3 Inclusión de levadura marina (*D. hansenii*) en alimento comercial BERNAQUA

La inclusión de levadura en el alimento comercial BERNAQUA se realizó de forma satisfactoria tanto en los microagregados elaborados con alginato de sodio (MBAL), así como con aceite de hígado de bacalao (MBAC). Se obtuvieron partículas con tamaños entre 40 y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 2A y 2B). Cabe mencionar que no se observó ninguna diferencia visual con respecto al alimento comercial BERNAQUA sin la inclusión de levadura (Fig. 2C). La inclusión de levaduras detectada con aceite de hígado de bacalao fue de  $5.5 \times 10^6$  UFC, mientras que con aspersion de alginato de sodio fue de  $6 \times 10^6$  UFC.

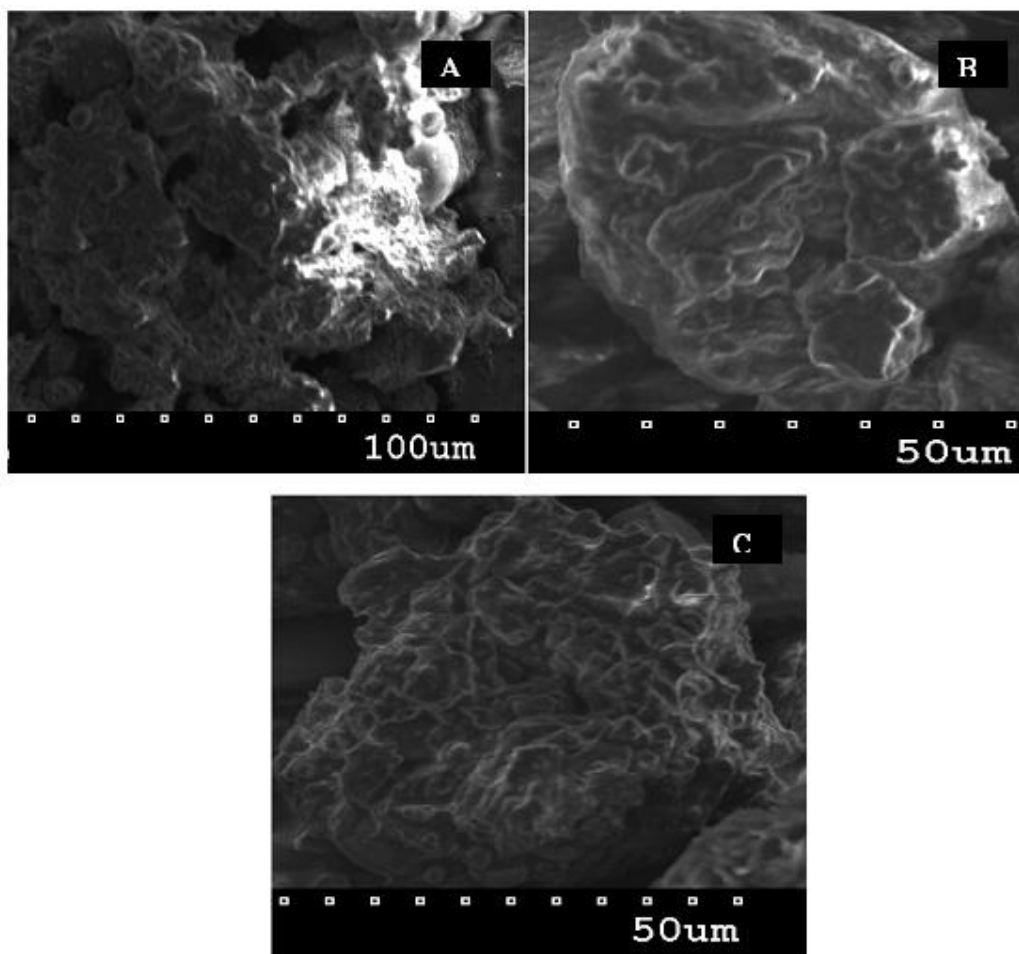


**Figura 2.**

Micrografía electrónica de barrido de microdietas con la levadura viva (*D. hansenii*) incluida, elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA con ligantes distintos A) microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) B) microagregado BERNAQUA con alginato de sodio (MBAL) C) alimento comercial BERNAQUA sin la inclusión de levadura (MB). A un aumento de 800x.

#### 8.4 Inclusión de levadura marina (*D. hansenii*) en alimento experimental

Los microagregados elaborados con alimento formulado reflejaron un tamaño de partícula entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro tanto con alginato de sodio (MFAL), así como con aceite de hígado de bacalao (MFAC). La viabilidad de levadura fue mayor en los microagregados elaborados con alginato de sodio ( $0.92 \times 10^6$  UFC/g de alimento; Fig. 3A) en comparación con los elaborados con aceite de hígado de bacalao ( $0.12 \times 10^6$  UFC/g de alimento; Fig. 3B).



**Figura 3.**

Micrografía electrónica de barrido las microdietas elaboradas con el alimento formulado con ligantes distintos A) Microagregado con levadura y alginato de sodio (MFAL), B) Microagregado con levadura y aceite de aceite de pescado (MFAC), y C) Microparticulado formulado sin inclusión de levadura (MF) aumento de 850x.



### 8.5 Análisis químicos proximales de las microdietas

En la Tabla IV se muestran los resultados de los análisis químicos proximales realizados a las microdietas y a la levadura marina (*D. hansenii*). El mayor porcentaje de proteína se obtuvo en el alimento microparticulado BERNAQUA (MB) con 54.14%, seguido del alimento microparticulado formulado (MF) con 52.73%. Mientras que el mayor porcentaje de extracto etéreo se encontró en el microagregado MFAC con 34.19%, seguido por el microagregado MBAC con 30.14%.

**Tabla IV.** Composición química proximal de las microdietas con inclusión de levadura marina (*D. hansenii*).

MICRODIETA	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Energía (cal/g)
Microparticulado F (MF)	52.73 ±0.26	16.14 ±0.07	4970.73
Microparticulado B (MB)	54.14 ±0.16	19.38 ±0.02	5155.35
Microagregado FAL (MFAL)	44.60 ±0.13	0.00 ±0.00	5270.30
Microagregado BAL (MBAL)	46.10 ±0.14	15.85 ±0.20	5241.37
Microagregado FAC (MFAC)	41.45 ±0.32	34.19 ±0.10	5495.95
Microagregado BAC (MBAC)	47.58 ±0.17	30.14 ±0.17	5606.43
Levadura <i>D. hansenii</i>	53.48	0.19	4734.27

### 8.6 Actividad enzimática específica de los extractos del tracto digestivo de *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*.

La cantidad de proteína soluble presente en los extractos crudos del tracto digestivo de los juveniles de cabrilla arenera y pargo amarillo (en ayuno) fue de 8.15 y 6.21 mg/ml respectivamente.

La actividad específica de los extractos digestivos de los juveniles de cabrilla arenera y pargo amarillo para las enzimas digestivas amilasa, tripsina, pepsina, lipasa y proteasa se muestran en las Tablas V y VI. Para los juveniles de cabrilla arenera se obtuvo la mayor actividad específica de la lipasa de 118 U/mg, seguida de la pepsina con 63.31 U/mg. En el caso del pargo amarillo la lipasa también presenta la mayor actividad con 28.16 U/mg, seguida de la amilasa con 1.66 U/mg.

**Tabla V.** Actividad específica de las enzimas digestivas en juveniles de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* (peso = 9.5g).

ENZIMA DIGESTIVA	U/mg de proteína
Amilasa	22.90 ± 2.03
Tripsina	0.08 ± 0.001
Pepsina	63.31 ± 1.18
Lipasa	118.62 ± 1.02
Proteasa	1.29 ± 0.10

**Tabla VI.** Actividad específica de las enzimas digestivas en juveniles de pargo amarillo *L. argentiventris* (peso = 2.0g).

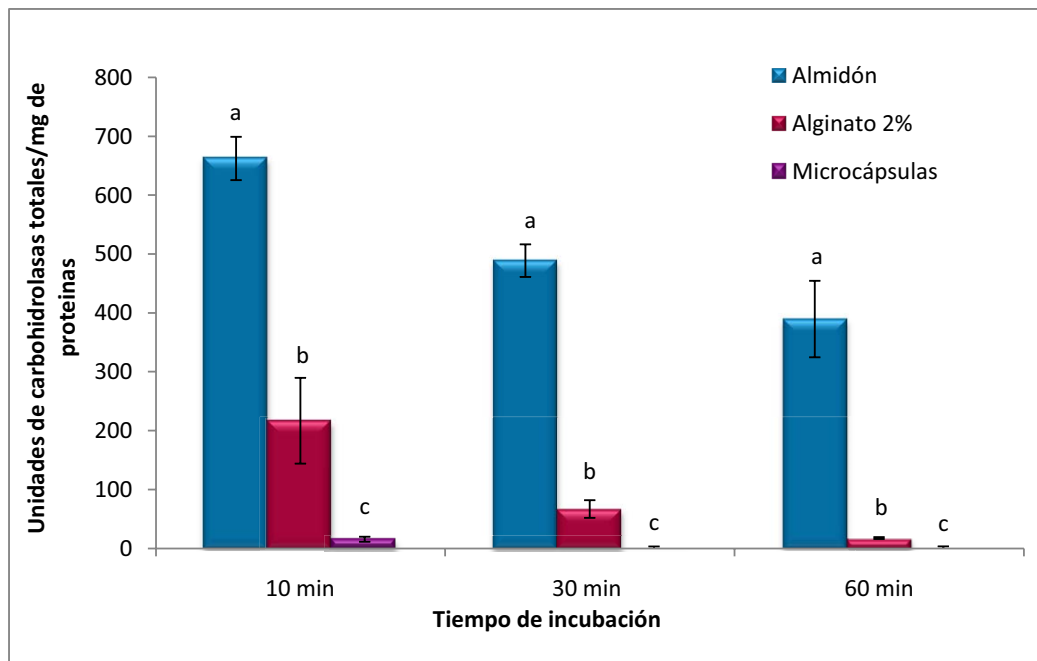
ENZIMA DIGESTIVA	U/mg de proteína
Amilasa	1.66 ± 0.79
Tripsina	0.02 ± 0.001
Pepsina	0.02 ± 1.09
Lipasa	28.16 ± 2.02
Proteasa	1.48 ± 0.12

## 8.7 DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE LOS ALIMENTOS

### 8.7.1 Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de los ligantes

#### Cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*):

La mayor digestibilidad *in vitro* de polisacáridos se observó con el almidón, reflejando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al alginato y a las microcápsulas (Fig. 4). También se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el grado de hidrólisis del almidón y el alginato con respecto al tiempo de incubación.

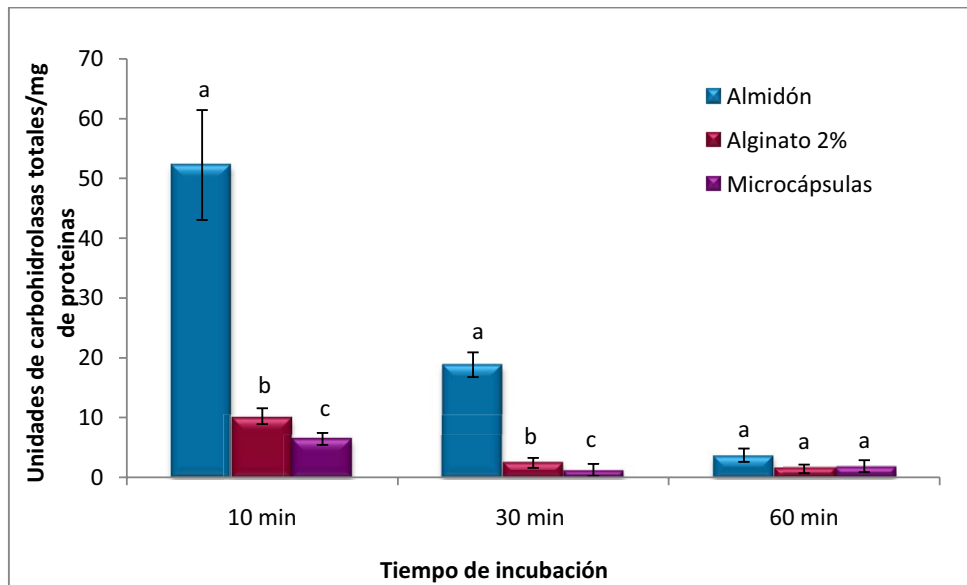


**Figura 4.**

Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de almidón, alginato 2% y microcápsulas utilizando un extracto crudo del tracto digestivo de la cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

**Pargo amarillo (*L. argentiventris*):**

La mayor digestibilidad *in vitro* se obtuvo con el almidón, reflejando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al alginato al 2% y a las microcápsulas. Estas diferencias fueron evidentes a los 10 y 30 minutos de incubación (Fig. 5), mientras que a los 60 minutos de incubación no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la digestibilidad *in vitro* del almidón, alginato y microcápsulas. Cabe destacar que el grado de hidrólisis del almidón disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) conforme transcurre el tiempo de incubación.

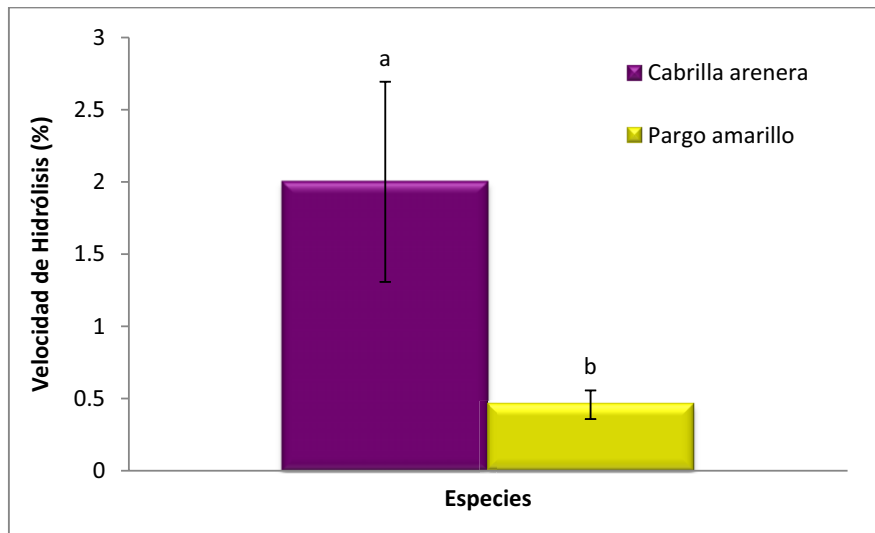


**Figura 5.**

Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de almidón, alginato 2% y microcápsulas utilizando un extracto digestivo del tracto digestivo de pargo amarillo (*L. argentiventris*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

### 8.7.2 Digestibilidad *in vitro* de lípidos de aceite de hígado de bacalao como ligante.

El extracto digestivo de cabrilla arenera reflejó una mayor velocidad de hidrólisis del aceite de hígado de bacalao en comparación con el extracto digestivo de pargo amarillo (Fig. 6). Dicha diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ).



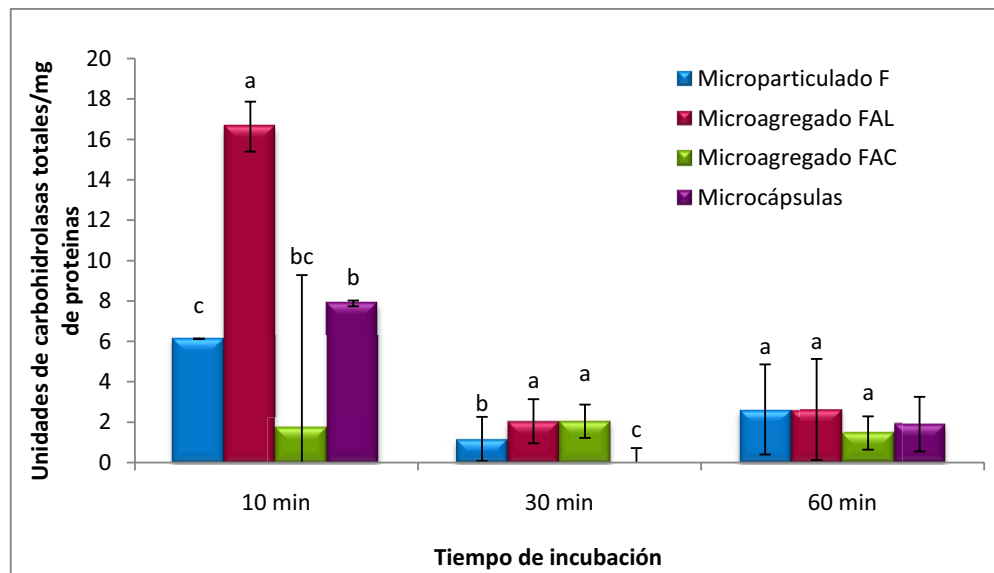
**Figura. 6**

Digestibilidad *in vitro* de lípidos de aceite de hígado de bacalao utilizado como ligante de levadura en algunos microagregados utilizando extracto crudo del tracto digestivo de la cabrilla arenera y del pargo amarillo. Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

### 8.7.3 Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de las microdietas

#### Cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*):

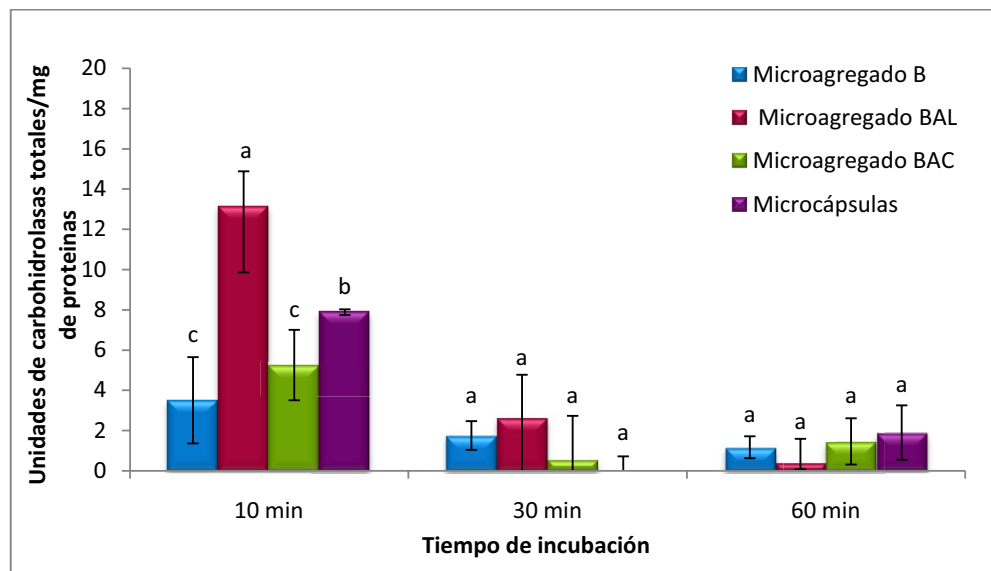
En el caso de las microdietas elaboradas con alimento microparticulado formulado, la mayor digestibilidad *in vitro* de polisacáridos se observó a los 10 minutos de incubación en los microagregados con alginato (MFAL; Fig. 7), siendo significativamente mayor que las demás dietas microagregadas y microcápsulas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.**

Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar y las barras de error la desviación estándar.

Por otro lado, en el caso de los microagregados elaborados con el alimento comercial BERNAQUA® (Fig. 8), la mayor digestibilidad significativa ( $p < 0.05$ ) se observó en el microagregado BAL a los 10 minutos de incubación. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las demás dietas, ni entre las dietas con respecto al tiempo de incubación.



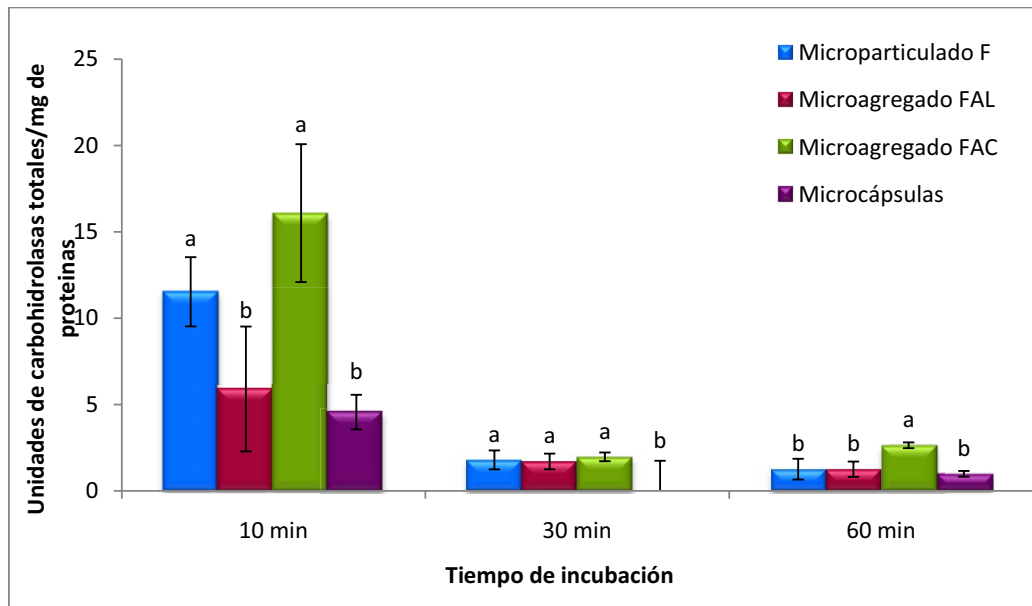
**Figura 8.**

Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

#### **Pargo amarillo (*L. argentiventris*):**

En el caso de las microdietas elaboradas con alimento microparticulado formulado, las mayores digestibilidades *in Vitro* de polisacáridos se observaron en los microagregados con aceite de pescado (MFAC) y el microparticulado formulado (MF; Fig. 9), siendo significativamente más altas que con

microagregados con alginato y microcápsulas ( $P < 0.05$ ). Por otra parte, a los 30 minutos de incubación la única diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) que se observó al comparar la digestibilidad de las microdietas fueron los microagregados FAC y las microcápsulas.

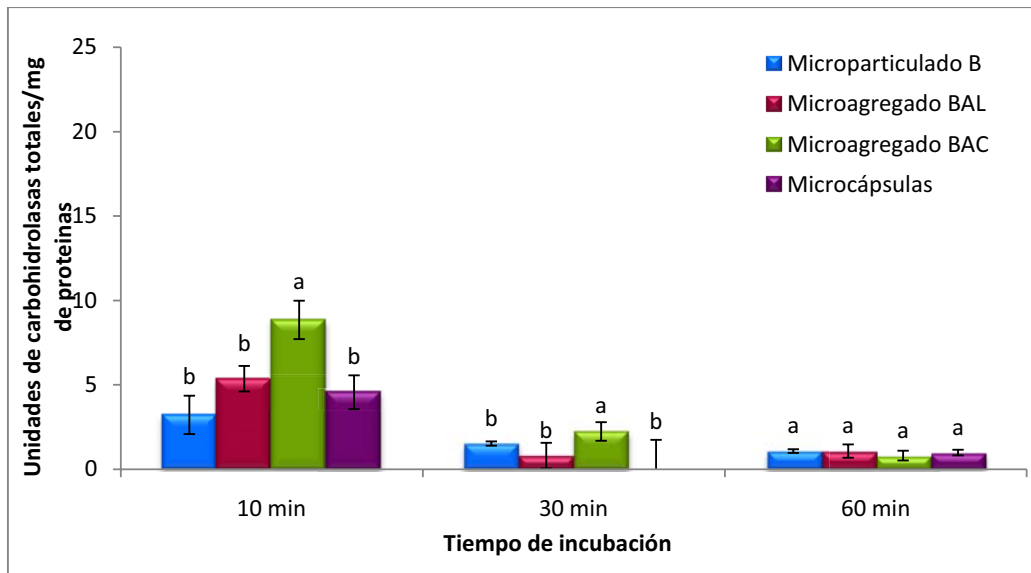


**Figura 9.**

Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo (*L. argentiventris*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

En el caso de los microagregados elaborados con el alimento comercial BERNAQUA, la mayor digestibilidad *in vitro* de polisacáridos se observó en los microagregados con aceite de pescado (MBAC; Fig. 10) a los 10 y 30 minutos de incubación. Esta microdieta reflejó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las demás aunque luego de 60 min de incubación ya no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Fig. 10).





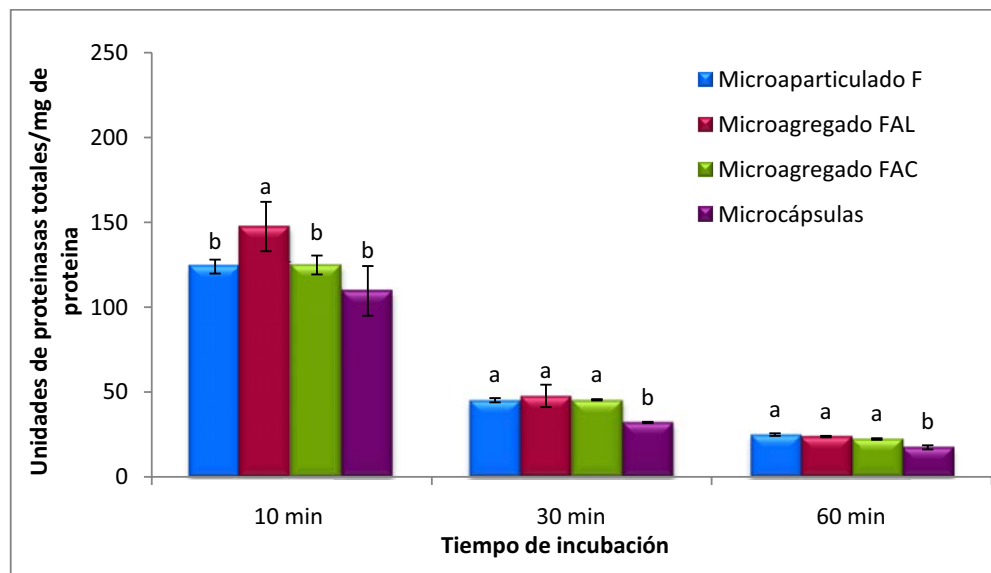
**Figura 10.**

Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo (*L. argentiventris*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

### 8.7.4 Digestibilidad *in vitro* de proteínas (pepsina)

#### Cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*):

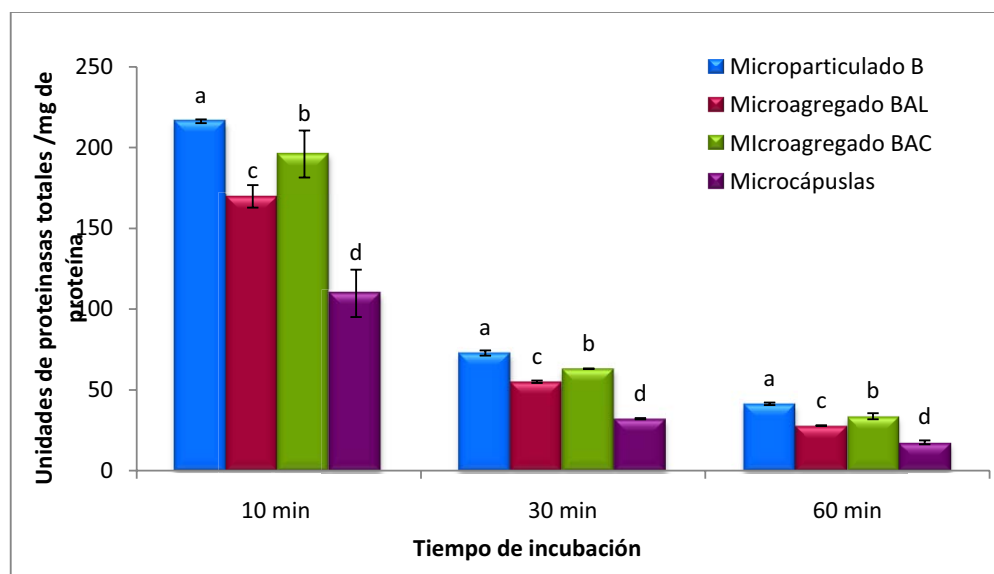
En el caso de las microdietas elaboradas con alimento microparticulado formulado, la mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas por la pepsina se observó en los microagregados con alginato (MFAL; Fig. 11), reflejando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las demás microdietas únicamente a los 10 minutos de incubación. Para los tiempos 30 y 60 min las microcápsulas fueron las que tuvieron digestibilidades significativamente menores que las demás microdietas.



**Figura 11.**

Digestibilidad *in vitro* de proteínas de: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

Por otro lado, en el caso de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA®, se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la digestibilidad *in vitro* de proteínas de todas las microdietas. La mayor digestibilidad en el tiempo de incubación de 10 min se observó con el microparticulado B (BERNAQUA sin modificar), seguido del microagregado BAC, el microagregado BAL y las microcápsulas. Dicho patrón fue similar para todos los tiempos evaluados, aunque con valores cada vez menores a medida que transcurrió el tiempo de incubación.



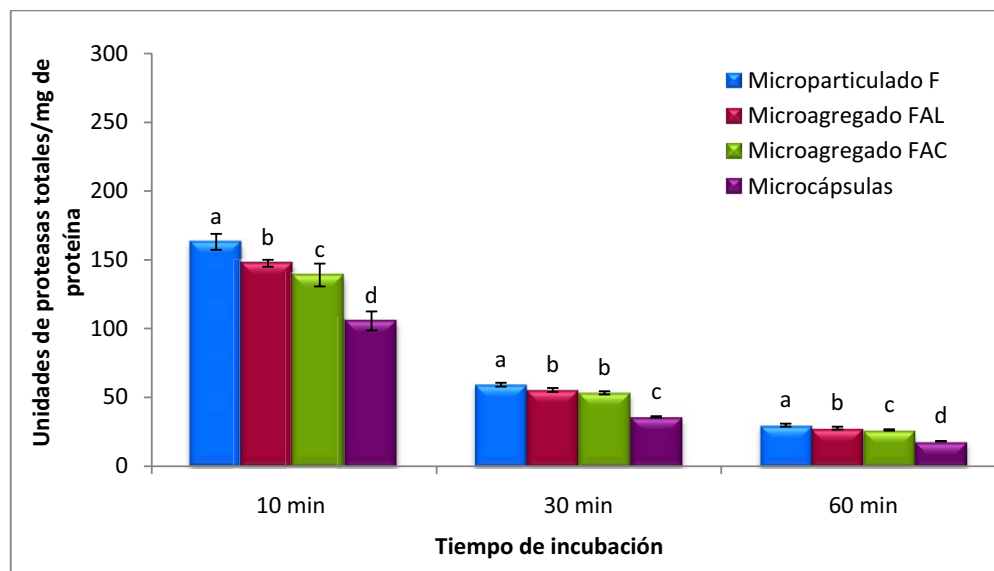
**Fig. 12**

Digestibilidad *in vitro* de proteínas de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error la desviación estándar.

#### **Pargo amarillo (*L. argentiventris*):**

En el caso de las microdietas elaboradas con alimento microparticulado formulado, la mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas con diferencias

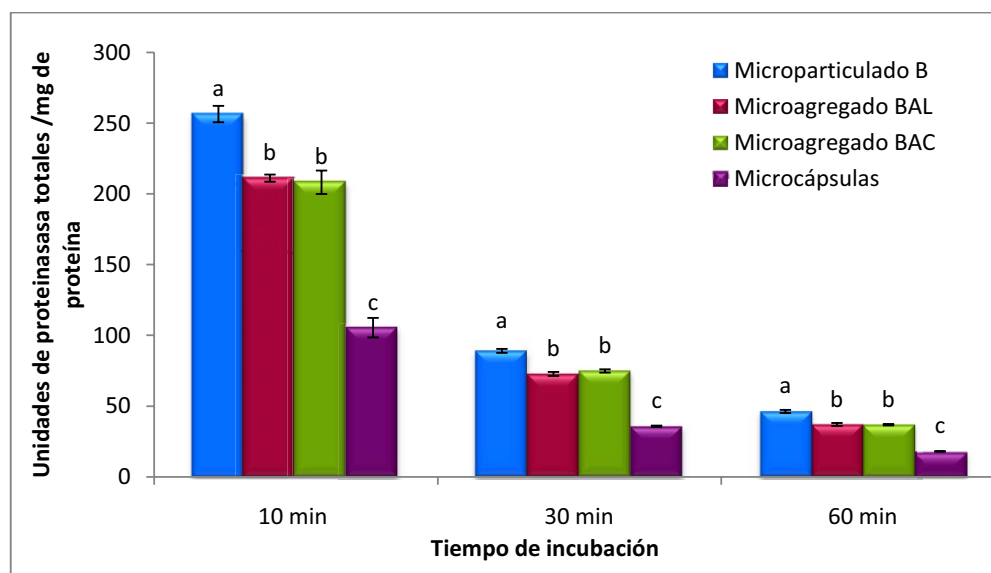
significativas ( $p < 0.05$ ) fue el microparticulado F (alimento formulado sin modificar), seguido de los microagregados FAL y FAC y microcápsulas, (Fig. 13). Los valores obtenidos fueron bastante similares y no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre el grado de hidrólisis de los microagregados FAL y FAC al tiempo 30 min. Al igual que en la mayoría de los análisis anteriores también se observó una disminución significativa en la digestibilidad *in vitro* de las microdietas a lo largo del tiempo de incubación.



**Figura 13.**

Digestibilidad *in vitro* de proteínas de: microagregado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo (*L. argentiventris*). Superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y barras muestra la desviación estándar.

En el caso de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA, la mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas se observó con el microparticulado B (BERNAQUA sin modificar) al compararlo con las demás microdietas (Fig. 14). Al comparar los valores obtenidos con los microagregados BAL y BAC no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). También se observó una clara disminución significativa ( $p>0.05$ ) de la digestibilidad *in vitro* de cada una de las microdietas a medida que transcurrió el tiempo de incubación.



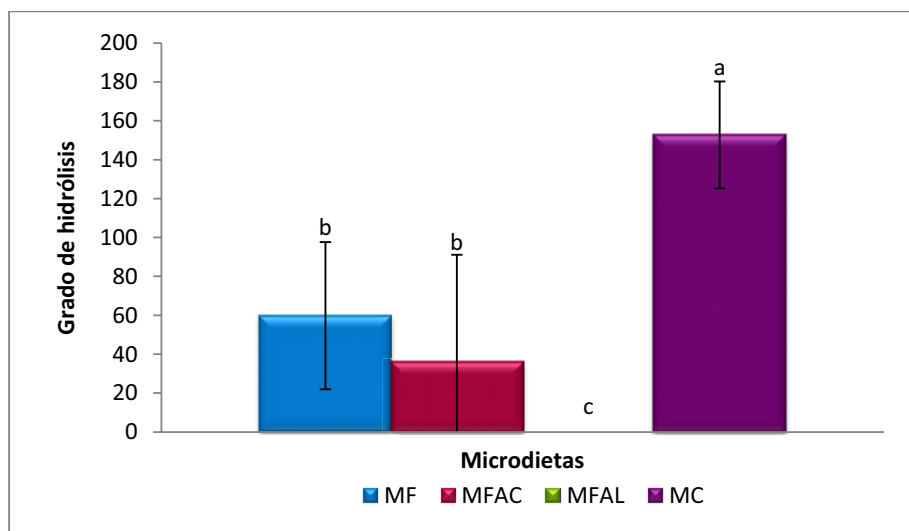
**Figura 14.**

Digestibilidad *in vitro* de proteínas de: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas de levadura marina (*D. hanseni*) (MC) utilizando un extracto digestivo de pargo amarillo (*L. argentiventris*). Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p<0.05$ ) entre dietas y las barras de error muestran la desviación estándar.

### 8.7.5 Digestibilidad *in vitro* de proteínas para tripsina por pH Stat.

#### Cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*):

En el caso de las microdietas elaboradas con alimento microparticulado formulado, el mayor grado de hidrólisis se observó con las microcápsulas (Fig. 15), reflejando diferencias significativas con las demás microdietas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15.**

Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de *P. maculatofasciatus*: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas (MC) utilizando extracto digestivo de cabrilla arenera. Diferentes literales denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre dietas y las barras de error muestran la desviación estándar.

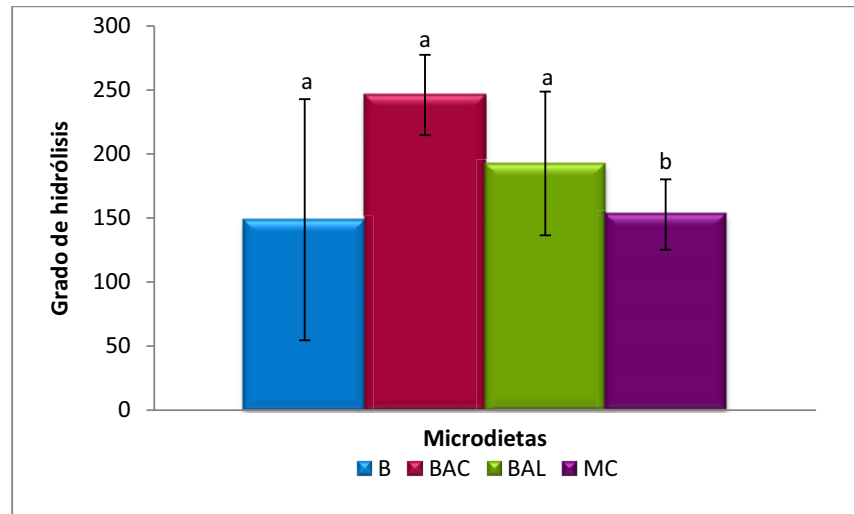
La mayor velocidad de hidrólisis se observó con las microcápsulas (Tabla VII), seguido del microparticulado F (alimento formulado sin modificar), mientras

que los microagregados con aceite (FAC) y con alginato (FAL) reflejaron velocidades significativamente menores ( $p < 0.05$ ).

**Tabla VII.** Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento formulado, utilizando un extracto de tracto digestivo de *P. maculatofasciatus*.

MICRODIETA	VH (%)
Microparticulado F	0.51 <sup>a</sup>
Microagregado FAC	0.06 <sup>b</sup>
Microagregado FAL	0 <sup>b</sup>
Microcápsulas	1.33 <sup>c</sup>

En el caso de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA, en la capacidad de hidrólisis del extracto digestivo de cabrilla arenera (Fig.16), no hubo diferencias significativas entre los valores. Al comparar las velocidades de hidrólisis de todas las microdietas, se observaron valores similares que no se diferenciaron significativamente entre sí (Tabla VIII).



**Figura 16.**

Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de *P. maculatofasciatus*: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas (MC). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y las barras de error muestran la desviación estándar.

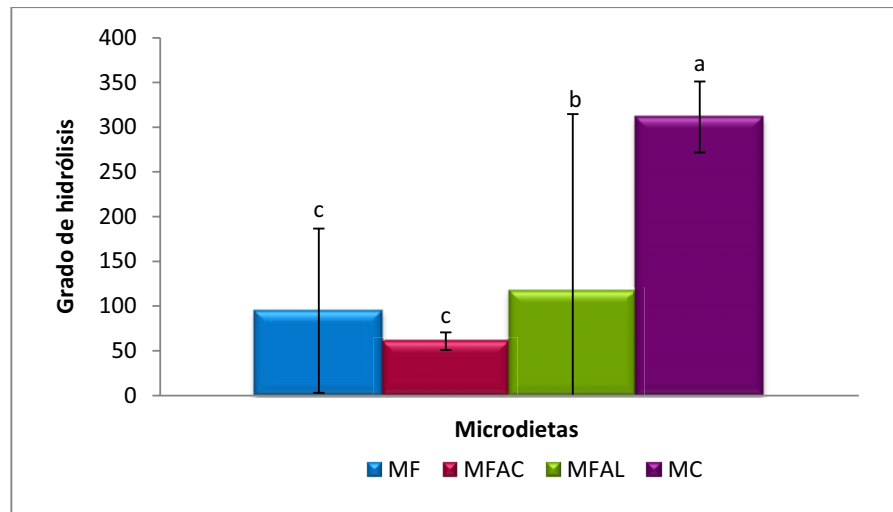
**Tabla VIII.** Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA utilizando un extracto de tracto digestivo de *P. maculatofasciatus*.

MICRODIETAS	VH (%)
Microparticulado B	1.26 <sup>a</sup>
Microagregado BAC	1.33 <sup>a</sup>
Microagregado BAL	1.35 <sup>a</sup>
Microcápsulas	1.33 <sup>a</sup>

**Pargo amarillo (*L. argentiventris*):**

Para las microdietas elaboradas con alimento microparticulado formulado, el mayor grado de hidrólisis de proteínas se observó en las microcápsulas (Fig. 17), reflejando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el alimento microparticulado F y el microagregado FAC. Asimismo, la mayor velocidad de hidrólisis se obtuvo también con las microcápsulas, diferenciándose significativamente ( $p < 0.05$ ) de las demás microdietas (Tabla IX).





**Figura 17.**

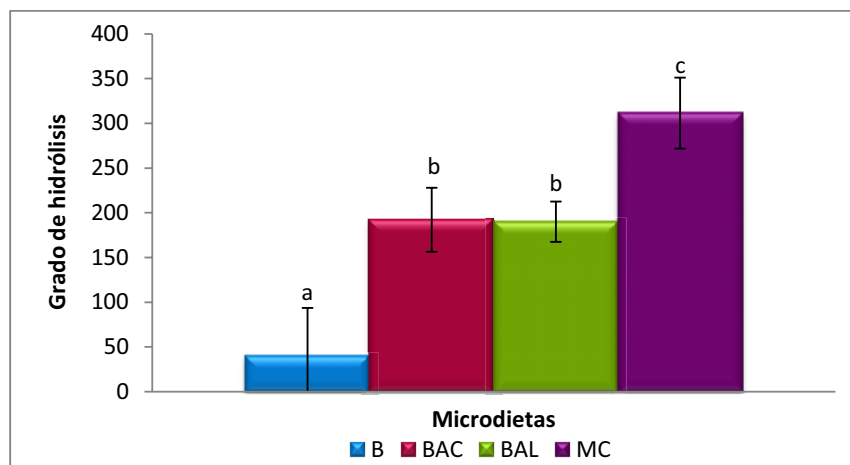
Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de *L. argentiventris*: microparticulado formulado (MF), microagregado formulado con alginato (MFAL), microagregado formulado con aceite de pescado (MFAC) y microcápsulas (MC). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y las barras de error muestran la diferencia significativa.

**TABLA IX.** Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento formulado utilizando extracto digestivo de pargo amarillo.

MICRODIETA	VH (%)
Microparticulado F	0.01 <sup>a</sup>
Microagregado FAC	0.23 <sup>a</sup>
Microagregado FAL	0.19 <sup>a</sup>
Microcápsulas	1.19 <sup>b</sup>

Por otro lado, en el caso de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA, la mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas por la tripsina se registró con las microcápsulas (Fig. 18). Esta dieta microencapsulada reflejó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a las demás microdietas. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las dietas microagregadas BAC y BAL. Al analizar la velocidad de hidrólisis de las microdietas, el mayor valor se observó con las microcápsulas aunque las

diferencias con las demás dietas no fueron significativas, a excepción de los microagregados BAC que reflejaron una velocidad de hidrólisis nula o no detectada (Tabla X).



**Figura 18.**

Grado de hidrólisis de proteínas para tripsina de *L. argentiventris*: microparticulado BERNAQUA (MB), microagregado BERNAQUA con alginato (MBAL), microagregado BERNAQUA con aceite de pescado (MBAC) y microcápsulas (MC). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**TABLA X.** Velocidad de hidrólisis (VH) de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA utilizando un extracto de tracto digestivo de pargo amarillo.

MICRODIETAS	VH (%)
Microparticulado B	0.91 <sup>a</sup>
Microagregado BAC	0 <sup>a</sup>
Microagregado BAL	1.13 <sup>a</sup>
Microcápsulas	1.19 <sup>b</sup>

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Microencapsulación de levadura viva *D. hansenii*

En este trabajo se logró aplicar la tecnología de inmovilización celular, mediante la microencapsulación de la levadura marina *D. hansenii*, de forma viable y como vehículo como probiótico para las primeras etapas de desarrollo de peces marinos. Ya que en los últimos 20 años, la administración de probióticos ha aumentado en la acuicultura, así como la comprensión en el manejo y preparación de productos diseñados para la alimentación de especies cultivables. Para lograr introducir los probióticos en el alimento, es crucial conocer la estabilidad de éste para garantizar su eficiencia y habilidad para proveer al hospedero de sus efectos benéficos. Según Wang *et al.* (2008) el cultivo del probiótico debe de ser capaz de mantener sus propiedades y viabilidad después del procesamiento y almacenamiento. Por esta razón Wang *et al.* (2008) propone incrementar la resistencia de los probióticos contra condiciones adversas tales como contenedores de oxígeno, adaptaciones al estrés, incorporación de micronutrientes como péptidos y aminoácidos y su presentación en microencapsulados.

En trabajos anteriores se ha utilizado la levadura marina *D. hansenii* cepa 3889 como probiótico para larvas y juveniles de peces marinos (Tovar *et al.*, 2004; Guzmán-Villanueva, 2008; Reyes *et al.*, 2008; Linares Aranda, 2008). Sin embargo, sola ha sido incluida en dieta microparticulada, incorporándose en la mezcla de los ingredientes, por lo que, la importancia de este trabajo radica principalmente que en acuicultura es el primer ensayo en la elaboración de microcápsulas de levaduras vivas como probióticos para su administración en primeras etapas del desarrollo de peces marinos. La técnica de microencapsulación o inmovilización celular ha sido utilizada anteriormente,

pero solo en la industria médica (Rosiński *et al.*, 2005), farmacéutica, alimenticia y agrícola principalmente (Zhang *et al.*, 2005).

En medicina, la técnica de bioencapsulación con alginato de calcio ha sido utilizada para la protección de sustancias biológicamente activas o probióticos y su liberación en sitios específicos como el colón, siendo la microencapsulación una biotecnología que permite la liberación en el intestino de agentes terapéuticos (Sultana *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2006 y Vos *et al.*, 2009). Al igual que en los trabajos de medicina, en acuicultura se busca la microencapsulación como vehículo para que la levadura marina colonice el tracto gastrointestinal del huésped, confiriéndole sus propiedades como probiótico. No obstante, Rosiński *et al.* (2005) menciona que uno de los problemas principales con la bioencapsulación, es la selección de células, así como también la producción de microcápsulas uniformes y la selección de polímeros para la elaboración del recubrimiento.

Sin embargo, Yúfera *et al.* (2005) menciona que una de las mayores ventajas en utilizar alginato como material de elaboración en las microcápsulas, es que los materiales de elaboración son muy baratos y amistosos con el medio ambiente y que los compuestos utilizados en la elaboración de las microcápsulas de membrana lipídica (Langdon *et al.*, 2007) o protéica (Yúfera *et al.*, 2000) son compuestos potencialmente tóxicos para el ambiente y levaduras, ya que utilizan ciclohexano y ácido tricloroacético. Yúfera *et al.* (2003) indica que estas cápsulas hechas por polimerización de proteína pueden incluir una gran variedad de distintos componentes y así liberarlos en el intestino de las larvas. Sin embargo, la tecnología utilizada para el encapsulamiento de levadura precisa ser menos agresivo, para preservar la viabilidad de la misma. Por tal motivo, la mejor técnica para la encapsulación de microorganismos vivos como las levaduras fue mediante la técnica de gelificación interna con gel alginato de

sodio como cubierta y cloruro de calcio como gelificante, ya que, el proceso de elaboración únicamente se basa en la transformación de la solución del alginato de sodio en alginato de calcio sin ser agresivo para las levaduras y mantener así, su viabilidad (Yúfera *et al.*, 2005).

Por otra parte, también se trató de elaborar otro tipo de microcápsulas de gelatina de bacalao, sin embargo el proceso de elaboración fue muy agresivo para la viabilidad de la levadura, ya que se necesita emulsionar la mezcla además de que en la última fase se requiere de acetona para la polimerización y endurecimiento de la gelatina.

Las microcápsulas de levadura no pueden utilizarse para el reemplazo del alimento vivo, sino como alimento funcional en combinación con la dieta adecuada según los requerimientos alimenticios, fisiología digestiva y comportamiento de la larvas de peces marinos a las cuales se quiera administrar los probióticos (Yúfera *et al.*, 2000). Puesto que las microcápsulas elaboradas por Chu y Ozkizilcik (1999), Yúfera *et al.* (2003; 2005) y Langdon *et al.* (2007), son utilizadas para el reemplazo de alimento vivo, en donde incluyen dieta formulada, hormonas, vitamina, péptidos y aminoácidos. Así mismo, en los intentos que se han realizado para el reemplazo de alimento vivo por microcápsulas (Chu y Ozkizilcik, 1999; Yúfera *et al.*, 2002; Conceição *et al.*, 2007) la sobrevivencia y el crecimiento larval no han sido mayores que los organismos alimentados con alimento vivo.

Yúfera *et al.*, (2005) menciona que la principal desventaja en utilizar el alginato de calcio como material de encapsulamiento, se debe a que dicho material es poroso, por lo que es incapaz de prevenir eficientemente la oxidación y degradación del material encapsulado por microorganismos presentes durante el almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, Zhang *et al.* (2005) sugiere que la

tecnología de encapsulamiento de enzimas y células requiere de una membrana semipermeable, como la que se forma por la porosidad del alginato de sodio, que permite el intercambio libre de moléculas importantes para la sobrevivencia de la célula, así como también de nutrientes, oxígeno, metabolitos esenciales y productos tóxicos del metabolismo celular.

Según Zhi-jie *et al.* (2008) las microcápsulas alginato/quitosano proveen un microambiente, que es construido durante el cultivo celular, incluyendo el gradiente de los nutrientes, metabolitos y temperatura. Además Qi *et al.* (2006) demostraron que la inmovilización celular de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* en microcápsulas, mejora el crecimiento e incrementa la actividad metabólica, lo que indica que las microcápsulas de alginato ofrecen un microambiente favorable para los microorganismos. Esta condición puede ser favorable para que *D. hansenii* tenga el efecto probiótico deseado, al ser administrado a larvas o juveniles de peces marinos, potencializando así sus efectos benéficos en los organismos hospederos.

## **9.2 Concentración de alginato en microcápsulas de levadura *D. hansenii***

La concentración de alginato de sodio utilizada en la elaboración de las microcápsulas de levadura marina (*D. hansenii*) fue del 2% (Fig.1). Esta misma concentración también fue utilizada por Vandenberg *et al.* (2001) en microcápsulas de albumina bovina, donde se obtuvo una buena retención de proteínas y al igual que en la elaboración de las microcápsulas de este trabajo con levadura, fue la concentración más manejable, que permitía un flujo fluido en el momento de la microencapsulación. Al utilizar una concentración mayor del 2% de alginato de sodio, hace que el proceso de encapsulación sea extremadamente difícil, debido a la naturaleza viscosa del medio (Vandenberg *et al.*, 2001).

### 9.3 Tamaño de las microcápsulas de levadura *D. hansenii*

Una de las características físicas más destacables de las microcápsulas de levadura obtenidas en este trabajo, es el tamaño de partícula, menor a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, el cual es ideal para utilizarse como alimento funcional para la administración de probióticos en las primeras etapas de desarrollo de peces marinos (Conceição *et al.*, 2007). Para obtener el menor tamaño posible de las microcápsulas de levaduras *D. hansenii*, se emplearon 2 bares de presión en el aerógrafo, siendo ésta la presión máxima permitida por el equipo y determinate para la obtención del tamaño final de las microcápsulas, y no así que el de los poros de salida de la pistola del mismo. Nuestros resultados concuerdan con los de Vandenberg *et al.* (2001) quienes encontraron que el diámetro de las microcápsulas se relaciona con la presión del aire con el que se elaboran.

### 9.4 Elaboración de microagregados con inclusión de levadura viva (*D. hansenii*)

La administración de alimento inerte en larvas de peces marinos, se lleva a cabo únicamente como segundo paso, después de ser alimentados con alimento vivo por varias semanas después de la eclosión y normalmente sustituido de forma parcial mediante un proceso llamado co-alimentación. Otra aplicación de las microdietas es la liberación de nutrientes necesarios y agentes profilácticos en acuicultura (Teshima *et al.*, 2000). Hasta la fecha, no se ha desarrollado alguna microdieta artificial que por sí sola soporte el crecimiento y sobrevivencia que se obtienen cuando las larvas son alimentadas con presas vivas además de que garantice un consumo eficiente y/o evite la pérdida de nutrientes por lixiviación. Por tal motivo los microagregados han sido utilizados para tratar de sustituir el alimento vivo con alimento inerte en larvas de peces marinos (Patridge y Southgate 1999; Teshima *et al.*, 2000; Nankervis y Southgate, 2009). Según Patridge y Southgate (1999) el tipo de ligante utilizado tiene un papel

muy importante en la atractibilidad y digestibilidad de los microagregados, una alta concentración del ligante, puede ocasionar la reducción en la digestibilidad de la microdieta.

Los microagregados elaborados con la dieta formulada y la dieta BERNAQUA con inclusión de levadura marina, fueron de dos tipos: uno elaborado con aceite de hígado de bacalao y el segundo con alginato de sodio al 2% como ligantes. En ambas formulaciones se buscó que los ingredientes otorgaran una viabilidad aceptable de la levadura marina en el alimento. Se obtuvo una mayor sobrevivencia celular en los microagregados elaborados con la dieta comercial BERNAQUA que en los microagregados elaborados con la dieta experimental. Sin embargo, en ambos casos resultó que el mejor ingrediente para la inclusión de levadura fue el alginato de sodio, obteniendo en los microagregados MBAL  $6 \times 10^6$  UFC y en los MFAL  $0.92 \times 10^6$  UFC. Mientras que en los microagregados elaborados con el aceite de hígado de bacalao como ligante se obtuvieron en los MBAC  $5.5 \times 10^6$  UFC y en los MFAC  $0.12 \times 10^6$  UFC. Este resultado posiblemente se deba a las características de cada uno de los ingredientes y el aporte de nutrientes de estos a la levadura.

Ha sido necesario el estudio de nuevas alternativas para cubrir estos aspectos, siendo una buena alternativa el uso de microagregados, que cumplan con las necesidades nutritivas y además provean de suplementos alimenticios que mejoren la sobrevivencia y crecimiento, así como también atractantes (Teshima *et al.*, 2000). Según Patridge y Southgate (1999) las dietas microagregadas son ingredientes alimenticios unidos dentro una matriz de hidocoloide gelificado o ligante, además estos pueden ser producidos sin un tamaño limitante, son flexibles en la naturaleza en la composición de su dieta y relativamente fáciles de preparar. A diferencia de las microcápsulas carecen de una pared lo cual ayuda a la digestión de la partícula.



### 9.5 Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de los ligantes

Los resultados muestran que ambos peces, *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*, poseen una mayor capacidad de hidrólisis sobre el almidón, con respecto a los otros dos sustratos probados, alginato y microcápsulas (Fig. 4 y 5). Sin embargo, la actividad de las carbohidrolasas de la cabrilla arenera y pargo amarillo, muestran una mayor afinidad por este sustrato, lo que nos indica una mayor actividad de la  $\alpha$ -amilasa en estos peces. Estudios previos han mostrado que la cabrilla arenera posee una capacidad digestiva importante desde su eclosión (Alvarez-González *et al.*, 2008), y se ha considerado un depredador bentónico con un amplio espectro alimenticio oportunista (hasta de 60 especies) (Carranza y Rosales, 2000). Por otra parte el pargo amarillo presentó menor capacidad de hidrólisis de carbohidratos que la cabrilla arenera, ya que los hábitos alimenticios de esta especie son carnívoros alimentándose principalmente de peces, crustáceos bentónicos, decápodos, cefalópodos y gasterópodos (Vázquez *et al.*, 2008). De la misma forma en los resultados obtenidos por Liñan *et al.* (2006) la actividad  $\alpha$ -amilasa *L. argentiventris* fue baja, atribuida a la misma causa.

En cuanto a la actividad obtenida con el alginato podemos observar que en ambos extractos presentan una actividad alginolítica, siendo tres y cinco veces menor que la actividad de tipo amilasa encontrada en la cabrilla arenera y el pargo amarillo respectivamente. Esta actividad enzimática normalmente es atribuida a la flora bacteriana encontrada en el tracto digestivo de los peces (Grisez *et al.*, 1997), ya que éste sustrato no se encuentra en la dieta de estos organismos. Sin embargo, la actividad de carbohidrolasas totales observada con las microcápsulas es mucho menor (cabrilla arenera 15.7 U/mg y pargo amarillo 6.43 U/mg), ya que al reaccionar el alginato de sodio con el carbonato de calcio este se convierte en alginato de calcio significativamente con respecto a la actividad del almidón (cabrilla arenera 662.52 U/mg y pargo amarillo 52.25

U/mg) y del alginato (cabrilla arenera 217.05 U/mg y pargo amarillo 9.91 U/mg), a pesar que éstas son elaboradas con éste último carbohidrato. Estos resultados posiblemente se deben a que la estructura molecular del almidón es más simple con respecto a la del alginato. Ya que la estructura del alginato esta compuesta por copolímeros arreglados linealmente en bloques con alternancia de azucares gulorónicos y manurónicos (Vandenburg *et al.*, 2001), mientras que el almidón esta constituido por cadenas largas no ramificadas de D-glucosa (Lehninger, 1995). Además la enzima  $\alpha$ -amilasa hidroliza al azar los enlaces  $\alpha(1-4)$  a lo largo de la cadena del almidón (Kusano *et al.*, 2001), mientras que la enzima alginato liasa degrada el alginato únicamente por los enlaces  $\beta(1-4)$  prefiriendo los residuos de los ácidos D-manurónico y L-gulorónico, en donde se obtiene una molécula de ácido urónico (Preston *et al.*, 2000).

Los reportes del uso de microcápsulas elaboradas con alginato para la nutrición de animales son amplios, sin embargo, se recomienda el conocimiento de la calidad, pureza, y viscosidad de este polímero, así como de una tecnología que brinde partículas uniformes, de poco tamaño para larvas con poca abertura bucal y que finalmente brinden estabilidad en el número de probióticos durante la elaboración, almacenamiento y paso por el estómago del hospedero (Heidebach *et al.*, 2009).

#### **9.6 Digestibilidad *in vitro* de lípidos de aceite de hígado de bacalao como ligante.**

La cabrilla arenera presenta mayor capacidad para la hidrólisis del aceite de pescado que el pargo amarillo (Fig. 6). Esta capacidad se demuestra en previos estudios donde se probaron distintos niveles de lípidos (5%, 10% y 15%) en dietas para juveniles de cabrilla arenera (Gleaves-López, 2005) donde se observaron actividades específicas más altas de lipasa en juveniles alimentados

con 5% de lípidos que en niveles mayores (48 U/mg de proteína). Carrasco-Chávez (2004), también encontró que en juveniles alimentados con la inclusión de lípidos del 15% presentaron diferencias significativas en cuanto a peso y longitud con respecto a los otros niveles de lípidos. En cuanto a pargo amarillo, éste presenta ligeramente una actividad específica más baja que la de la cabrilla arenera, como fue obtenido en previos estudios por Liñán *et al.*, (2006) (20 U/mg de proteína). En cuanto la información de los requerimientos nutricionales y capacidad digestiva en larvas o juveniles de pargo amarillo, no existen datos debido a que es una especie nueva en acuicultura. En especies relacionadas, García-Ortega (2008) indica que los requerimientos de lípidos en juveniles de pargo lunajero, *L. guttatus* son de 6 al 12%, siendo también los niveles óptimos en juveniles pargo de manglar, *L. argentimaculatus* (Catacutan *et al.*, 2001), sin embargo en pargo criollo, *L. analis* es de 6-9% de lípidos (Watanabe *et al.*, 2001).

### **9.7 Digestibilidad *in vitro* de polisacáridos de las microdietas**

#### ***Paralabrax maculatofasciatus***

Según Civera *et al.* (2002) en el momento del reemplazo alimenticio del alimento vivo por el inerte (destete) en larvas de cabrilla arenera, solo algunos organismos tienden a aceptar fácilmente este cambio, sin embargo aquellos que no logran adaptarse puedan morir. La aceptación de una dieta inerte involucra características físicas de la micropartícula (tamaño, textura y digestibilidad), así como también influye el tipo de ingredientes de la formulación de la dieta.

En los resultados obtenidos de la digestibilidad *in vitro* de polisacáridos utilizando el extracto digestivo de cabrilla arenera, se observó que la mayor hidrólisis de las microdietas elaboradas a partir de una dieta experimental,

fueron los microagregados MFAL (Fig. 7). Estas microdietas podrían ser utilizados en etapas larvarias, puesto que en los resultados obtenidos por Peña *et al.* (2003) mencionan que la cabrilla arenera posee la habilidad de digerir y absorber carbohidratos complejos en etapas tempranas de desarrollo, así como también en los resultados de asimilación de microagregados de alginato en larvas de *Lates calcarifer* (Patridge y Southgate, 1999).

No se pudieron hacer pruebas de lixiviación, pero en el trabajo de Patridge y Southgate (1999) mencionan que los microagregados tienen un alto porcentaje de lixiviación de los ingredientes, debido a la falta de una pared verdadera (Önal y Langdon, 2005) por lo que también, posiblemente este fenómeno este sucediendo dentro de la reacción y por consiguiente se de la hidrólisis del resto de los ingredientes provenientes de origen carbohidrático de la dieta como la harina y el gluten de trigo. Además las levaduras presentes en la microdieta pueden estar contribuyendo con productos originados del metabolismo de la misma célula. Ya que según Talebnia y Taherzadeh (2007) encontraron que al inmovilizar levadura *S. cerevisiae* tiende a almacenar carbohidratos como el glucógeno y trehalosa debido a la limitación de nutrientes para la protección del citosol, así como también como almacenamiento de glucosa contra condiciones adversas en el crecimiento.

La mayor digestibilidad, representada por la mayor actividad de carbohidrolasas, de los las microdietas elaboradas con BERNAQUA fue también en los microagregados elaborados con alginato (Fig. 8). Al observar los ingredientes presentes en la etiqueta del alimento comercial BERNAQUA utilizados para su elaboración, no se encontraron ingredientes de origen vegetal, como los que se encuentran en la dieta experimental. Posiblemente se deba a que durante los 10 minutos de incubación, la cobertura de alginato este siendo hidrolizada por las bacterias presentes en el extracto digestivo, liberando

a las levaduras y éstas consuman los azúcares disponibles. En trabajos previos sobre inmovilización celular (Qi *et al.*, 2006) se ha demostrado que el consumo de glucosa en levadura *S. cerevisiae* encapsuladas suele llevarse a cabo a mayor velocidad que con las levaduras libres, donde la inmovilización mejora el crecimiento e incrementa la actividad metabólica. La metodología de la digestibilidad *in vitro* es específica para la digestibilidad de polisacáridos como el almidón, que consiste en la digestión de los azúcares por la acción de la enzima  $\alpha$ -amilasa de la cabrilla arenosa, en donde se mide la digestibilidad de almidones o el glucógeno (Nolasco *et al.*, 2006). Sin embargo, con la modificación de la metodología, no fue posible distinguir de dónde provenía los azúcares reductores productos de la reacción, por lo que se asumió una actividad de tipo carbohidrolasa general presente en el extracto del tracto digestivo de los peces.

#### *Lutjanus argentiventris*

En el caso de la digestibilidad de polisacáridos con el extracto digestivo de pargo amarillo sobre las microdietas se esperaban resultados semejantes a los obtenidos en la digestibilidad de las microdietas con extracto digestivo de cabrilla arenosa. Sin embargo, la mayor digestibilidad se obtuvo en las dietas microagregadas MFAC (Fig. 9) y MBAC (Fig. 10). Este resultado se puede deber a la baja actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa que presenta el pargo amarillo a diferencia de la cabrilla arenosa (Tabla V y VI). Krogdahl *et al.* (2000) menciona que el nivel de lípidos en la dieta afecta la digestibilidad de polisacáridos como el almidón que fue menos digerido en dietas con altos niveles de grasa, que en las dietas con menos grasa en *Salmo salar*. En especies carnívoras como el pargo amarillo, los polisacáridos no provenientes del almidón, como el alginato puede reducir la utilización de otros nutrientes y así actuar como antinutriente (Krogdahl *et al.*, 2000). La presencia de antinutrientes en los alimentos para peces afecta la digestibilidad de proteína, causando efectos fisiológicos adversos

y reduciendo el crecimiento (Alarcón *et al.*, 2001). Por otra parte, Hemre *et al.* (2002) menciona que los peces carnívoros alimentados con dietas ricas en almidón presentan poca habilidad de tomar la glucosa y se asume que estos peces se encuentran en un estrés metabólico constante, que a su vez puede dar lugar a la supresión de funciones inmunes.

### **9.8 Digestibilidad *in vitro* de proteínas específica para pepsina**

#### ***Paralabrax maculatofasciatus***

En la capacidad de hidrólisis de las microdietas elaboradas con alimento formulado con extracto digestivo de cabrilla arenera, la mayor digestibilidad fue la dieta microagregada MFAL con diferencia significativa con respecto a las demás microdietas (Fig. 11). Sin embargo, al contrastar este resultado con el porcentaje de proteína de las microdietas obtenido de los análisis químico proximales, ésta contiene un 44.6%, mientras que el microparticulado F un 52.73%. Patridge y Southgate (1999) menciona que la digestibilidad de los microagregados se encuentra relacionada al tipo de ligante utilizado. Por ejemplo, el alginato mejora el grado de digestibilidad como se vio en este trabajo; mientras que no se encuentran diferencias significativas en el grado de hidrólisis entre el microparticulado F (control) y la dieta microagregada MFAC cuyo contenido de proteína es de 41.45%, menor al porcentaje proteico presente en el microparticulado F.

La mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas en las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA fue el microparticulado B (Fig. 12). A diferencia del resultado obtenido en las microdietas elaboradas con dieta experimental, la digestibilidad de las microdietas si concuerda con el porcentaje de proteína. Puesto que la dieta micropartícula B contiene un 54.14% de proteína siendo el mayor porcentaje entre las demás microdietas. Otro factor

importante, es considerar la calidad de la proteína utilizada en cada formulación, sin embargo, este análisis no fue realizado en este trabajo.

En las otras microdietas también concuerda el grado de hidrólisis con el porcentaje de proteína, en donde el mayor grado de hidrólisis de los microagregados con BERNAQUA fue el BAC con 47.58% de proteína, seguido de BAL con 46.10%. Durante los demás tiempos de hidrólisis presentan el mismo patrón.

También se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grado de hidrólisis entre las microdietas elaboradas con el alimento experimental y BERNAQUA. A pesar de que en otros trabajos se ha utilizado la dieta experimental como alimento control, ya que ha dado los mejores resultados en la sobrevivencia y crecimiento en el destete de larvas y juveniles de cabrilla arenera y sardinera respectivamente (Linares, 2007; Guzmán, 2008; y Reyes, 2008). Sin embargo, se obtuvo un mayor grado de hidrólisis en las microdietas elaboradas con BERNAQUA quizás debido al tipo y calidad de ingredientes utilizados para su manufactura.

### *Lutjanus argentiventris*

La mayor digestibilidad de las microdietas elaboradas con alimento experimental usando el extracto de pargo amarillo, fue observado en la dieta microparticulada F (Fig. 13). Este resultado concuerda con el mayor porcentaje de proteína (52.73%) detectado entre dietas. Al comparar la digestibilidad de los microagregados FAL y FAC no se encontraron diferencias significativas entre ambas digestibilidades en contenido de proteína. Sin embargo, se observan una ligera diferencia en el grado de digestibilidad, siendo mayor en los microagregados FAL atribuido al porcentaje de proteína de 44.6% de dicha

microdieta. Mientras que el grado de digestibilidad de los microagregados FAC es menor, en donde el porcentaje de proteína es de 41.45%.

De la misma manera sucede con las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA, teniendo la mayor digestibilidad en la dieta microparticulada B (Fig. 14). Mientras que los microagregados BAL y BAC no muestran diferencia significativa entre ellos, pero si se observa una ligera diferencia en el grado de digestibilidad entre ambas, siendo mayor en BAC que en BAL, debido también a la concentración de proteína en dichas microdietas. Ya que BAL contiene un porcentaje de proteína de 46.10%, mientras que BAC de 47.58%.

Al comparar el grado de hidrólisis entre las microdietas elaboradas con el alimento formulado y alimento comercial BERNAQUA con extracto digestivo de pargo amarillo, existe una diferencia significativa siendo mayor en las microdietas del alimento BERNAQUA, debido probablemente a la calidad de los ingredientes, ya que el porcentaje de proteínas es mayor y que el pargo amarillo es un pez con hábitos carnívoros.

### **9.9 Digestibilidad *in vitro* de proteínas para tripsina por pH Stat.**

#### ***Paralabrax maculatofasciatus***

El principio en el que se basa la técnica del pH-Stat es que la hidrólisis se da a un pH neutro, y con la disociación de los grupos carboxilo liberados, disminuye el pH de la mezcla de reacción, de esta forma, la cantidad de base (NaOH) consumida para mantener el pH constante es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos hidrolizados, es decir el grado de hidrólisis (GH) (Alvarez-González, 2003).



En la digestibilidad de las microdietas elaboradas con alimento experimental con extracto digestivo de cabrilla arenosa (Fig. 15). El mayor grado de hidrólisis fue obtenido con las microcápsulas de levadura debido a la presencia del 2% de hidrolizado de calamar, que fue adicionado como attractante. Cahu y Zambonino Infante (1995) mencionan que la incorporación de hidrolizado de proteína en las dietas estimula la actividad de peptidasas citosólicas, además de facilitar la asimilación de los aminoácidos en larvas jóvenes. Sin embargo, un nivel excesivo de hidrolizado de proteína en alimento larvario conduce efectos negativos en el crecimiento y sobrevivencia larvaria, ya que posiblemente afecte la regulación en la síntesis y secreción de tripsina (Zambonino Infante y Cahu, 2007). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el grado de hidrólisis entre los microagregados FAC y el microparticulado F. Estos resultados posiblemente se deban a que la fuente proteica de la dieta proviene de harinas de sardina, calamar y concentrado proteico soluble de pescado, en donde las proteínas están intactas. Zambonino Infante y Cahu (2007) han demostrado que la utilización de proteínas intactas disminuye de 2 a 3 veces la velocidad de absorción en larvas con respecto a las proteínas hidrolizadas.

En el caso de las microdietas elaboradas con el alimento comercial BERNAQUA (Fig.16) la mayor digestibilidad fue en los microagregados BAC, únicamente con diferencia significativa con las microcápsulas de levadura. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre el microparticulado B y microagregados BAC y BAL, se observa que el microagregado BAC muestra un mayor grado de hidrólisis, lo que demuestra que la incorporación de un ligante externo es muy importante, ya que como lo dijeron Holme *et al.*, (2009) el tipo y fuerza del ligante tienen un papel importante en la determinación de atractividad y digestibilidad de los microagregados.

### *Lutjanus argentiventris*

En la digestibilidad *in vitro* de proteínas para tripsina en las microdietas con extracto digestivo de pargo amarillo, se observó la mayor digestibilidad en las microcápsulas tanto en las microdietas elaboradas con alimento experimental (Fig. 17) y alimento comercial BERNAQUA (Fig. 18) con diferencia significativa. Este resultado se puede deber a que el hidrolizado de calamar utilizado como atrayente no se encuentra en el interior de la microcápsula, ya que forma parte de la cubierta. Por lo que el ingrediente queda expuesto a una hidrólisis fácil por parte de las enzimas. Civera-Cerecedo *et al.* (2008) encontraron que en larvas de cabrilla arenera alimentadas con harina hidrolizada de pescado mostraron mejor crecimiento y sobrevivencia al 22 DDE, relacionado a la mayor disposición de aminoácidos en el hidrolizado de proteína, que son más digestibles, absorbibles y metabolizados con mayor facilidad. La administración de los hidrolizados larvas de peces marinos, contribuyen a la maduración del tracto digestivo (Cahu *et al.*, 1999) y este a su vez incrementa el crecimiento de los organismos debido a la poca energía utilizada en la hidrólisis de proteínas (Zambonino-Infante *et al.*, 1997).

La digestibilidad del microparticulado B fue significativamente menor con respecto a las demás microdietas, en donde el ligante además de contribuir a la inclusión de la levadura, puede atribuir propiedades al alimento como una mayor digestibilidad (Teshima *et al.*, 2000). Se ha observado que la hidrólisis de tripsina es afectada por la calidad del alimento, presentando mayor actividad en dietas con niveles altos de proteína. También se ha demostrado que la actividad específica de la tripsina es un marcador importante en el proceso de digestión, correlacionado con la eficiencia de conversión y grado de crecimiento en *Salmo salar* (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006).

## 10. CONCLUSIONES

- La mejor técnica para la encapsulación y preservación de la viabilidad de las levaduras marinas *D. hansenii* es la gelificación interna con alginato de calcio al 2%.
- Se logró obtener la inclusión de levadura viva en microcápsulas menores de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, ideal para la co-alimentación de las larvas de peces marinos.
- Se logró la inclusión de la levadura viva *D. hansenii* en alimento experimental y comercial BERNAQUA utilizando como ligante alginato de sodio y aceite de hígado de bacalao, en un tamaño de partícula de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- El mejor ligante para la inclusión de levadura *D. hansenii* en ambos alimentos (experimental y BERNAQUA) fue el alginato de sodio.
- En los microagregados elaborados con BERNAQUA se obtuvo una mayor sobrevivencia de levaduras.
- Ambas especies de peces marinos (*P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*) poseen mayor capacidad de hidrólisis sobre el almidón que sobre el alginato debido a la actividad de  $\alpha$ -amilasa.
- La actividad alginolítica es menor que la de  $\alpha$ -amilasa, ya que esta actividad depende de la composición específica de la flora bacteriana del tracto digestivo en ambas especies de peces marinos (*P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*).

- El tipo de ligante utilizado para la elaboración de los microagregados afecta la digestibilidad de los mismos dependiendo de los hábitos alimenticios de la especie a la cual se le desea administrar.
- El mejor ligante para la inclusión de levadura como probiótico para *P. maculatofasciatus* es el alginato de sodio, ya que se obtuvo el mayor grado de hidrólisis en los microagregados MFAL y MBAL en la digestibilidad *in vitro* de polisacáridos y no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto la digestibilidad *in vitro* de proteínas (pepsina y tripsina).
- El mejor ligante para la inclusión de levadura para probiótico para *L. argentiventris* es el aceite de hígado de bacalao, puesto que se obtuvo el mayor grado de hidrólisis en los microagregados MFAC y MBAC en la digestibilidad *in vitro* de polisacáridos y no se observaron diferencias significativas en cuanto la digestibilidad *in vitro* de proteínas (pepsina y tripsina).
- El hidrolizado de calamar utilizado como attractante en las microcápsulas de levaduras confiere una mayor digestibilidad *in vitro* de proteínas.

## 11. PERSPECTIVAS

- Evaluar *in vivo* el efecto de las microdietas con la inclusión de levadura *D. hansenii* sobre el crecimiento, sobrevivencia y desarrollo de larvas de *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*.
  
- Realizar pruebas de lixiviación de los microagregados con la inclusión de levadura *D. hansenii* con ambos ligantes (alginato y aceite de hígado de bacalao) y microcápsulas.
  
- Medir la absorción y/o liberación de glucosa de la levadura marina *D. hansenii* para evaluar la contribución de los microorganismos en la digestibilidad de las microdietas.
  
- Realizar pruebas *in vivo* de liberación de las levaduras encapsuladas en el tracto digestivo en larvas de *P. maculatofasciatus* y *L. argentiventris*.

## 12. REFERENCIAS

- Abdulaziz A., P. Rosamma y I. Sarojeni Bright Singh. 2008. Chitosan as a wall material for a microencapsulated delivery system for *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) larvae. *Aquaculture Research*. 39; 885-890 pp.
- Alarcón F.J., M. Díaz y F.J. Moyano. 1996. Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. *CIHAEM-options Mediterraneennes*. 113-121.
- Alarcón F.J., F.J. Moyano, M. Díaz, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* techniques. *Aquaculture Nutrition*. 5; 107-113.
- Alarcón F.J., F.L. García-Carreño y M.A. Navarrete del Toro. 2001. Effect of plant protease inhibitors on digestive protease in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 24; 179-189.
- Alvarez-González C.A. 2003. Ontogenía enzimática y nutrición larvaria de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis de doctorado. CICIMAR-IPN. 220 pp.
- Alvarez-González C.A., F.J. Moyano-López, R. Civera-Cerecedo, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortiz-Galindo, H. Nolasco-Soria, D. Tovar-Ramírez and S. Dumas. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II. Electrophoretic análisis, *Fish. Physiol. Biochem*, DOI 10.1007/s10695-008-9276-4).
- Andlid T., R. Vázquez-Juárez y L. Gustafsson. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology*. 30; 321-324.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiology*. 22; 79-89.
- Avilés-Quevedo A. y J.M. Mazón Suástegui. 1996. Cultivo de peces marinos. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. 651 – 684 pp.

- Barnabé G. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 519 pp.
- Barnes M.E., D.J. Durben, S.G. Reeves y R. Sanders. 2006. Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McConaughy strain rainbow trout. *Aquaculture Nutrition*. 12; 388-394.
- Barrows, F. T. y W. A. Lellis. 1996. Diet and nutrition. Pages 315–321 in R. C. Summerfelt, editor. *Walleye culture manual*. NCRAC Culture. Series 101. North Central Regional Aquaculture Center Publications Office, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Barrows, F.T. y W.A. Lellis. 2006. Effect of Diet Processing Method and Ingredient Substitution on Feed Characteristics and Survival of Larval Walleye, *Sander vitreus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 37, No. 2; 154-160.
- Baskerville-Bridges B. y L.J. Kling. 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture Nutrition* 6; 171-182.
- Boulhic M. y J. Gabaudan. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture* 102; 373-396.
- Cahu C.L. y Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 109A, No. 3 pp. 213-222.
- Cahu C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1995. Effect on the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic and intestinal peptidases. *Fish Physiology Biochemistry*. 14; 209-214.
- Cahu C.L., J.L. Zambonino-Infante, P. Quazuguel y M. M. Le Gall. 1999. Protein hydrolysate vs. Fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*. 171; 109-119.
- Cahu C. y J. Zambonino Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200; 161-180 pp.

- Cara J.B., F.J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of White bream. *Journal of Fish Biology* 63; 48- 58.
- Carranza Mendoza M y J.A. Rosales Casián. 2000. The feeding habits of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in Punta Banda estuary, Ensenada, B.C. *CalCOFI Reports* 41; 194-200.
- Carrasco-Chávez, V. 2004. Variación de ácidos grasos durante la ontogenia inicial y requerimientos lipídicos de juveniles en cautiverio de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 76 pp.
- Catacutan M.R., G.E. Pagador y S. Teshima. 2001. Effect of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1775). *Aquaculture Research*. 32; 811-818.
- Chu F. y S. Ozkizilcik. 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 237; 1-9.
- Civera-Cerecedo R., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, H. Nolasco-Soria, C.A. Alvarez-González, B. Anguas-Vélez, R. Peña-Martínez, M. Rosales-Velázquez, V. Carrasco-Chávez, R. García Gómez y E. Goytortúa. 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. 352-406. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Rique Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés y N. Simoes, editores. VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad de Nuevo León, México.
- Civera-Cerecedo R., C.A. Alvarez-González y F.J. Moyano-López. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. En: Cruz Suárez, L.E., D. Rique Marie, M.G. Nieto López, D. Villareal, V. Scholz y M. González. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Civera-Cerecedo R., C.A. Alvarez-González, R. E. García-Gómez, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortiz-Galindo, M.O. Rosales-Velázquez y T. Grayeb-Del Álamo y F.J. Moyano-López. 2008. Effect of microparticulate diets on growth and survival of spotted sand bass larvae, *Paralabrax*



- maculatofasciatus*, at two early weaning times. Journal of the World Aquaculture Society. 39; 22-36.
- Conceição L., S. Morais y I. Rønnestad. 2007. Tracers in fish larvae nutrition: A review of methods and applications. Aquaculture. 267; 62-75.
- Divakaran, S. y C.A. Ostrowski. 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. Journal World Aquaculture Society 1; 35-40.
- Drusch S. y S. Berg. 2008. Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. Food Chemistry. 109; 17-24.
- Erlanger B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95; 271-278.
- Ezquerro M., F. García-Carreño y O. Carrillo. 1998. *In vitro* digestibility of dietary protein source for white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 163; 123-136.
- Fernández I., M. Díaz, T. Martínez y F.J. Moyano. 2001. A quick method for the assessment of activity and inhibition of fish amylases. Aquaculture Nutrition 7; 19-23.
- Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. FAO: Pacífico centro-oriental. Volumen III. Vertebrados-Parte 2. Roma.
- García-Ortega A., A. Koussoulaki, H. Boer y J. Verreth. 2000. *In vitro* protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and of microbound diet for larvae fish. Aquaculture Research 31; 475-477.
- García-Ortega A. 2008. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Spheroides annulatus*), new species for marine aquaculture. Fish Physiology Biochemistry. 35; 69-80.

- García-Gómez R.E. 2006. Uso de dietas microencapsuladas para la alimentación de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Mestría. CICIMAR-IPN. La Paz, México. 63 pp.
- Gatesoupe F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180; 147-165.
- Gatesoupe F.J. 2007. Live yeast in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*. 267; 20-30.
- Gleaves López, V. 2005. Efecto de diferentes concentraciones de lípidos sobre la expresión de la lipasa pancreática de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología Marina, UABCS. México, La Paz, B.C.S. 56 pp.
- Govani J., G.W. Boehlet y Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16; 59-77.
- Grisez ,L., J. Reyniers, L. Verdonck, J. Swings, F. Ollevier. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development, *Aquaculture*, 155:387-399.
- Guillaume J., S. Kaushik, P. Bergot y R. Métailler. 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 475 pp.
- Guzmán-Villanueva L.T. 2008. Efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii* silvestre e inhibida de su actividad ornitín-descarboxilasa sobre el desarrollo larvario de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Tesis de Maestría. CIBNOR. La Paz, México. 96 pp.
- Heidebach, T., Petra Forst, Ulrich Kulozik. 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins, *Food Hydrocolloids* (2009), doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.006

- Hemre G.I., T.P. Mommsen y Å. Krogdahl. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*. 8; 175-194.
- Holme M-H., C. Zeng y P.C. Southgate. 2009. A review of recent progress toward development of formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. *Aquaculture*. 286; 164-175.
- Iijima N., S. Tanaka y Y. Ota. 1998. Purification y characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pargus major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 59-69.
- Khemis I.B., J. Noue y C. Auder. 2000. Feeding larvae of Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) with live prey or microencapsulated diet: linear growth and protein, RNA and DNA content. *Aquaculture Research*. 31; 377-386.
- Kolkovski S., J. Curnow y J. King. 2004. Intensive rearing system for fish larvae research I. Marine fish larval rearing system. *Aquaculture Engineering* 31; 295-308.
- Krogdahl Å., G. I. Hemre y T. P. Mommsen. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*. 11; 103 – 122 pp.
- Kurokawa T. y T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzymes synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 141; 267-276.
- Kusano T, N. Izumita, S. Inui y H. Chive. 2001. A preliminary study on structural change on degradation of starch Granules in Tartary Buckwheat. 8<sup>th</sup> ISB: 532-536.
- Langdon C. 2003. Microparticule type for delivering nutrient to marine fish larvae. *Aquaculture* 227; 259-275.

- Langdon C., B. Clack y U. Önal. 2007. Complex microparticules for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and pharmaceuticals to marine fish larvae. *Aquaculture* 268; 143-148.
- Lazo J.P., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera y C.R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 265; 194-205.
- Linares-Aranda M. 2007. Efecto de la incorporación de levaduras vivas en la actividad enzimática digestiva en juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Tesis de Maestría. CIBNOR. La Paz, México.
- Liñán-Rivera, C. , Gleaves-López, V. , García-Gómez, R. E., Olalde-Rodríguez, A.M. , Pérez-Urbiola, J.C. and Tovar-Ramírez, D. 2006. Comparative study of digestive enzymes present in *Lutjanus colorado*, *L. argentiventris* and *L. novemfasciatus*. **XII International Symposium of Fish Nutrition and Feeding 2006** Biarritz, Francia, 28 mayo-1 junio.
- Mahious A.S., F.J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler y F. Ollevier. 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International*. 14: 219-229.
- Muhlía-Almazán A., A. Sánchez-Paz y F. García-Carreño. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *Journal of Comparative Physiology Biochemical, Systems and Environmental Physiology*.
- Nankervis L. y P.C. Southgate. 2006. An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microbound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*. 257; 453-464.
- Nankervis L. y P. C. Southgate. 2009. Enzyme and acid treatment of fish meal for incorporation into formulated microbound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture Nutrition*. 15; 135-143.
- Nelson J.S. 1994. *Fishes of the world*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Tercera Edición. 600pp.
- Nolasco H., A. Monte-Martínez, P. Hinojosa, R. Civera-Cerecedo y F. Vega-Villasante. 2006. Digestibilidad *in Vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapa Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villareal

- Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5. 377-395 pp.
- Olalde-Rodríguez A.M. 2005. Efecto de la espermina en la expresión del gen de la amilasa e inmunoglobulina M durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría. CIBNOR. La Paz, México. 88 pp.
- Önal U. y C. J. Langdon. 2000. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquaculture Nutrition*. 6; 159-170 pp.
- Önal U. y C. Langdon. 2005. Development and characterization of complex particles for delivery of amino acids to early marine fish larvae. *Marine Biology*. 146; 1031-1038.
- Ortiz-Galindo. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 64 pp.
- Partridge G.J. y P.C. Southgate. 1999. The effect of binder composition on ingestion and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calcarifer* Bloch larvae. *Aquaculture Research* 30; 879-886.
- Peña R., S. Dumas, m. Villalejo-Fuerte, J.L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219; 633-644.
- Preston L., T.Y. Wong, C.L. Bender y N.L. Schiller. 2000. Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *Journal of Bacteriology* Vol. 182, No. 21, 6268-6271.
- Prista C, A. Soeiro, P. Vesely, A. Almargo, J. Ramos y M.C. Loureiro-Dias. 2002. Genes from *Debaryomyces hansenii* increase SALT tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. *FEMS Yeast Research* 2; 151-157.
- Pristina C., M.C. Loureiro-Dias, V. Montiel, R. García y J. Ramos. 2005. Mechanism underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS yeast research* 5; 693-701.

- Qi W., J. Maa, W. Yu, Y. Xie, W. Wang y X. Ma. 2006. Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme and Microbial Technology*. 38; 697-704.
- Reyes Becerril M. C. 2007. Efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*. Tesis de Doctorado. La Paz, México. CIBNOR.
- Ribeiro L., C. Sarasquete y M.T. Dinis. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171; 293-308.
- Rønnestad I., Y. Kamisaka, L.E.C. Conceição, S. Morais y S.K. Tonheim. 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture* 268; 82-97.
- Rosiński S., D. Lewiński, M. Wójcik, G. Orive, J.L. Pedraz y A. Weryński. 2005. Mass transfer characteristics of poly-lysine, poly-ornithine and poly-methylene-co-guanidine membrane coated alginate microcapsules. *Journal of Membrane Science*. 254; 249-257.
- Rungruangsak-Torrissen K., Rustad A., J. Sunde, S.A. Eliane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Negård, T.A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana y G. Venturini. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the science of food and agriculture*. 82:644-654.
- Rungruangsak-Torrissen K., R. Moss, L.H. Andresen, A. Berg y R. Waagbø. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 32; 7-23 pp.
- Santamaría-Miranda A., M. Suacedo-Lozano, M.N. Herrera-Moreno y J.P. Apún-Molina. 2005. Hábitos alimenticios del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* y del pargo rojo *Lutjanus colorado* (Pisces: Lutjanidae) en el norte de Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(1); 33-44.
- Sarasquete M. C., A. Polo y M. L. González de Canales. 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones

- Turing the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. Histochemical Journal 25; 430-437 pp.
- Segner H., V. Reinecke, M. Kloas, W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Biol. 119; 471-486.
- Serrano-Pinto V. y J. Caraveo-Patiño. 1999. Survival of yellow snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters 1869) at different salinities in captivity. Aquaculture Research 30; 467- 470.
- Sherman F. 1991. Getting started with yeast. En: Guthrie Ch., Fink G.R. (Eds.), Methods in Enzymology. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Vol. 194, Academic Press, New York, 3-21 pp.
- Spilliaert R. y Á. Gudmundsdóttir. 1999. Atlantic Cod Trypsin Y-Member of a Novel Trypsin Group. Marine Biotechnology 1; 598-607.
- Stroud R. 1975. A family of proteins-cutting proteins. Sci. Am. 231; 74-89.
- Sultana K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris y K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology. 62; 47-55.
- Sunde J., S.A. Eiane, A. Rustad, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygård, G. Venturini y K. Rungruangsak-Torrissen. 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acids pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition 10; 261-277.
- Supannapong P., T. Pimsalee, T. A-komol, A. Engkagul, U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi y K. Rungruangsak-Torrissen. 2007. Digestive enzymes and in-vitro digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel. *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*. Aquaculture Int. DOI 10.1007/s10499-007-9156-4
- Talebnia F. y M. J. Taherzadeh. 2007. Physiological and morphological study of encapsulated *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 41; 683-688.

- Teshima S., M. Ishikawa y S. Koshio. 2000. Nutritional assessment and feed intake of microparticulate diet in crustaceans and fish. *Aquaculture Research*. 31; 691-702.
- Teshima S.-I., S. Koshio, M. Ishikawa, M. S. Alam y L. H. H. Hernández. 2004. Effects of protein and lipid sources on the growth and survival of fed sea bream *Pargus major* and Japanese flounder *Paralichtis olivaceus* receiving micro-bound diets during larval and early juvenile stage. *Aquaculture Nutrition*. 10; 279-287.
- Tonheim S., A. Nordgreen, I. Høgøy, K. Hamre, y I. Rønnestad. 2007. *In vitro* digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture*. 262; 426-435.
- Tovar D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204; 113-123.
- Tovar-Ramírez D., J. Zambonino-Infante, C. Cahu, F.J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*. 234: 415 – 427.
- Vandenberg G.W., C. Drolet, S.L. Scott y J. de la Noüe. 2001. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/ intestinal simulation. *Journal of Controlled Release*. 77; 297-307.
- Vázquez R. I., J. Rodríguez, L.A. Abitia y F. Galván. 2008. Food habits of the Bellow snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) (Percoidei: Lutjanidae) in La Paz Bay, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43 (2); 295 – 302 pp.
- Vega-Villasante F., H. Nolasco y R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Peneaus californiensis*: Properties of the amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106B 3; 547-550.
- Versaw W., S.L. Cuppett, D.D. Winters y L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54; 232-254.



- Vine N.G., W.D. Leukes y H. Kaiser. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*. 231: 145-152.
- Vine N. G., D.W. Leukes y H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30; 404-427.
- Vos P., M. Bučko, P. Gemeiner, M. Navrátil, J. Švitel, M. Faas, B. Løkensgard, G. Skjak-Braek, Y. Morch, A. Vikartovská, I. Lacík, G. Kolláriková, G. Orive, D. Poncelet, J. Pedraz y M. Ansorge-Schumacher. 2009. Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials*, doi: 10.1016/j. biomaterials.2009.01.14.
- Waché Y., F. Auffray, F.J. Gatesoupe, J. Zambonino, V. Gayet, L. Labbé, C. Quentel. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the Honest of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*. 258; 470-478.
- Wang Y., J. Li y J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*. 281; 1-4.
- Watanabe W.O., S.C. Ellis y J. Cháves. 2001. Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. *Journal World Aquaculture Society*. 32; 30-40.
- Wu. Z y G. Jiang. 2007. Purification and characterization of trypsin-like enzymes from *Neomysis japonica* using BAPNA as substrate. *International Journal of peptide research and therapeutics*. Vol. 14, No. 2, 75-80 pp.
- Yúfera M., C. Fernández-Díaz, E. Pascual, M.C. Sarasquette, F.J. Moyano, M. Díaz. F.J. Alarcón, M. García Gallego y G. Parra. 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6; 143-152.
- Yúfera M., S. Kolkovski, C. Fernández-Díaz, J. Rinchar, K.J. Lee y K. Dabrowski. 2003. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. *Aquaculture*. 227: 277 – 291.
- Yúfera D., C. Fernández-Díaz y E. Pascual. 2005. Food microparticules for larval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture* 248; 253-262.

- Yúfera M. y M.J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268; 53-63.
- Zambonino Infante J.L. y C.L. Cahu. 1993. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. Vol. 12, No. 5; 399-408.
- Zambonino-Infante J. L., C. L. Cahu y A. Peres. 1997. Partial substitution of di- and tri-peptides for native proteinin sea bass diet improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition*. 127; 608-614.
- Zambonino-Infante J.L y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine larvae. *Comparative Biochemistry and Phisiology Part C* 130; 477-487.
- Zambonino-Infante J.L. y C.L. Cahu. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268; 98-105.
- Zhang L., S. Yao, Y. Guan. 2005. Effects of poly(methylene-co-guanidine) on microbial in an alginate/cellulose sulphate-CaCl<sub>2</sub>/poly (methylene-co-guanidine) capsules system. *Process Biochemistry*. 40; 189-193.
- Zhi-jie S., L. Shuang-yue, L. Guo-Jun, Z. Jing, Y. Wei-ting, W. Wei y M. Xiaojun. 2008. Metabolic response of different osmo-sensitive *Sacchromyces cerevisiae* to ACA microcapsule. *Enzyme and Microbial Technology* 42; 576-582.