



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO MANANO-OLIGOSACÁRIDOS
(MOS), EN JUVENILES DE PEJELAGARTO
(*Atractosteus tropicus*).**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA
ISABEL DEL CARMEN NÁJERA ARZOLA**

**DIRECTORES:
DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
DR. ENRIC GISBERT CASAS**

Villahermosa, Tabasco; Junio del 2017.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION**



JUNIO 05 DE 2017

**C. ISABEL DEL CARMEN NÁJERA ARZOLA
PAS. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MANANO-OLIGOSACÁRIDOS (MOS), EN JUVENILES DE PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*)"**, asesorado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dra. Susana Camarillo Coop, Dr. Rafael Martínez García, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dr. Emir Saúl Peña Marín y M. en C. Otilio Méndez Marín.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**M. EN C. ROSÁ MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA**

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MANANO-OLIGOSACÁRIDOS (MOS), EN JUVENILES DE PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*)"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro, autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 05 de Junio de 2017.

AUTORIZO



ISABEL DEL CRMEN NÁJERA ARZOLA

Dedicatoria



Más a Dios gracias, el cual hace que siempre
triunfemos en Cristo Jesús. *2 Corintios 2:14*

Matilde Arzola Barios †

A mi madre dedico este gran paso en mi
vida académica, en su memoria.

Jesús Nájera Ledesma

Gracias por animarme a cumplir esta meta,
y que, de forma incondicional, entendiste
mis ausencias y mis malos momentos.

Raquel Ruiz Bautista

Efraín Ruiz Díaz

Gracias por permitirme ser parte de su familia
por su amor incondicional y por animarme
a culminar esta meta.

A mi familia

Que hicieron que este logro fuera posible.
Gracias por existir.

Agradecimientos

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad para continuar mi trayectoria académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado, mediante la beca nacional para estudios de Maestría (CVU 666819) y beca para mi estancia de investigación internacional (Becas Mixtas) en el Institut D'investigació Agroalimentària de la Generalitat de Catalunya (IRTA, España) y a al CONACYT por la Beca MIXTA y Al proyecto denominado "Fortalecimiento de la Maestría en Ciencias Ambientales para su permanencia en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT" Clave: TAB-2014-C29-245836" por el apoyo para la realización de la estancia de investigación..

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González (UJAT) y al Dr. Enric Gisbert Casas (IRTA), por su apoyo incondicional y su destacable calidad humana.

A mis amigos de laboratorio Carlos Alfonso Frías Quintana (UJAT) y Olga Bellot (IRTA), por compartirme sus conocimientos.

A Mikhail Solovyev, Anna Toldra Filella y Diana Castro Ruiz, por su compañerismo, durante mi estancia en España.

A mis amigas Argelia Lorca y Fanny de la Cruz, por sus ánimos, compañerismo y cariño, las llevo en el corazón.

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. ANTECEDENTES	5
2.2 Importancia del uso de los Manan oligosacáridos (MOS) en las dietas.....	6
III. JUSTIFICACIÓN	8
IV. OBJETIVOS.....	10
4.1 Objetivo General	10
4.2 Objetivos Específicos	10
V. LITERATURA CITADA	11
ARTICULO EN EXTENSO	15



I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura busca la optimación de los procesos y las mejores estrategias de alimentación en las distintas etapas del cultivo a fin de obtener organismos saludables y que contribuyan ante un producto de alta calidad. Por ello, los mecanismos de respuestas físicos, químicos, biológicos y tensiones pueden alterar funciones fisiológicas, lo que contribuye a desarrollar una alta susceptibilidad a estrés o enfermedades. Por lo tanto, son de suma importancia los alimentos funcionales para contrarrestar agentes patógenos.

Gatlin y Li (2004), define como alimentación funcional a elaborar una dieta con un balance nutricional, suplementarla con aditivos, suministrarla y que promueva la salud y la resistencia a las enfermedades en los cultivos de peces. Las estrategias de alimentación tales como la suplementación en las dietas de inmunoestimulantes, probióticos, prebióticos y simbióticos, pueden ayudar a reducir la susceptibilidad de los peces a las enfermedades, donde la restricción del uso de los antibióticos en los alimentos de peces; ha generado el aumento de las investigaciones en el uso de aditivos antes mencionados.

Los inmunoestimulantes son sustancias naturales o sintéticas capaces de modular la respuesta inmune del animal (Anderson, 1992) o por diferentes rutas de señalamiento celular (Dalmo y Børgwald, 2008), aumentando la resistencia a diferentes enfermedades (Cáceres *et al.*, 2004). La aplicación de los inmunestimulantes, es por tres vías: mediante vacunación, baños de inmersión y la suplementación de antígenos a través de dietas con altas dosis.

El requerimiento de las altas dosis de antígeno se debe a la degradación de material bioactivo en el sistema digestivo del pez. La encapsulación minimiza la protección del antígeno por el paso del estómago (Romalde *et al.*, 2004) y de esta manera es degradado en la parte baja del intestino, donde el antígeno se absorbe





hacia el torrente circulatorio. El uso de los inmunoestimulantes, están limitados por el estrés derivado de la manipulación; las dietas no obtienen una inmunidad tan fuerte y de amplio rango como la producida por las vacunas. Los antígenos deben ser recubiertos para evitar que sean destruidos en el agua o en el estómago del pez (Vanderverg, 2004) y representan un problema de salud pública, porque el tiempo de retiro del pez es muy largo.

Los probióticos son microorganismos vivos (Gibson y Roberfroid, 1995), al ser adicionados en la dieta ejercen un efecto benéfico para el sistema digestivo del animal, regulando los mecanismos de defensa ante patógenos sin afectar las funciones fisiológicas. El principal inconveniente es, que solo una pequeña proporción de microorganismos vivos llegan hasta el intestino. Esto hacen que la efectividad y supervivencia para ejercer su funcionalidad sea muy variable entre especies.

Los prebióticos, son ingredientes no digeribles que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de una bacteria benéfica a un grupo de ellas en el sistema digestivo (Gibson y Roberfroid, 1995). Los simbióticos es la combinación de probióticos (microorganismos vivos) y prebióticos (ingredientes no digeribles) que afectan positivamente al hospedero, mejorando la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de la dieta en el sistema digestivo (Gibson y Roberfroid, 1995). Por lo tanto, al combinarse presenta un efecto sinérgico, mejorando la efectividad que tienen al administrarse por separado (Cerezuela, 2012), pero son escasos los estudios realizados del uso de simbióticos como promotores de la salud.

Por lo tanto, los prebióticos son de mayor importancia, ya que su función es el cambio total de la comunidad microbiana a uno dominado por bacterias benéficas (Manning y Gibson, 2004). El Manan oligosacárido (MOS) ha sido es el más estudiado en especies de importancia económica, presentando efectos





significativos en la lubina *Dicentrarchus labrax* (Torrecillas *et al.*, 2007, 2012), trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Staykov *et al.*, 2007a; Yilmaz *et al.*, 2007 y Rodríguez *et al.*, 2008); tilapia del nilo *Oreochromis niloticus* (Samrongpan *et al.*, 2008), lenguado *Paralichthys olivaceus* (Ye *et al.*, 2011) y la dorada *Sparus aurata* (Gültepe *et al.*, 2011).

Sin embargo, el uso de MOS como prebiótico en la nutrición de peces está limitado por la composición de la dieta, el tiempo del experimento, las condiciones del cultivo, la especie, la edad y la condición de estrés (Volpatti *et al.*, 1998). Por tal motivo, este estudio se propuso a determinar los efectos de los diferentes niveles de suplementación de MOS en crecimiento, supervivencia y actividad de enzimas digestivas de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.





II. ANTECEDENTES

La digestión es un proceso que combina acciones enzimáticas específicas para cada tipo de macronutrientes y transforma las macromoléculas en partículas más pequeñas y son asimiladas (Moyano *et al.*, 1996).

Una vez que el pez ingiere la comida, es lubricado por el mucus, que se produce en boca, faringe y esófago, presentando poca actividad enzimática, los movimiento peristálticos y los nervios intrínsecos ayudan al esófago a llevar el alimento ingerido al estómago, donde secreta mucus y el bolo se mezcla con los jugos gástricos y posteriormente es trasladado al intestino, donde las enzimas y los jugos pancreáticos y entéricos, continúan secretando, nutrientes a la digestión (Fig. 1).

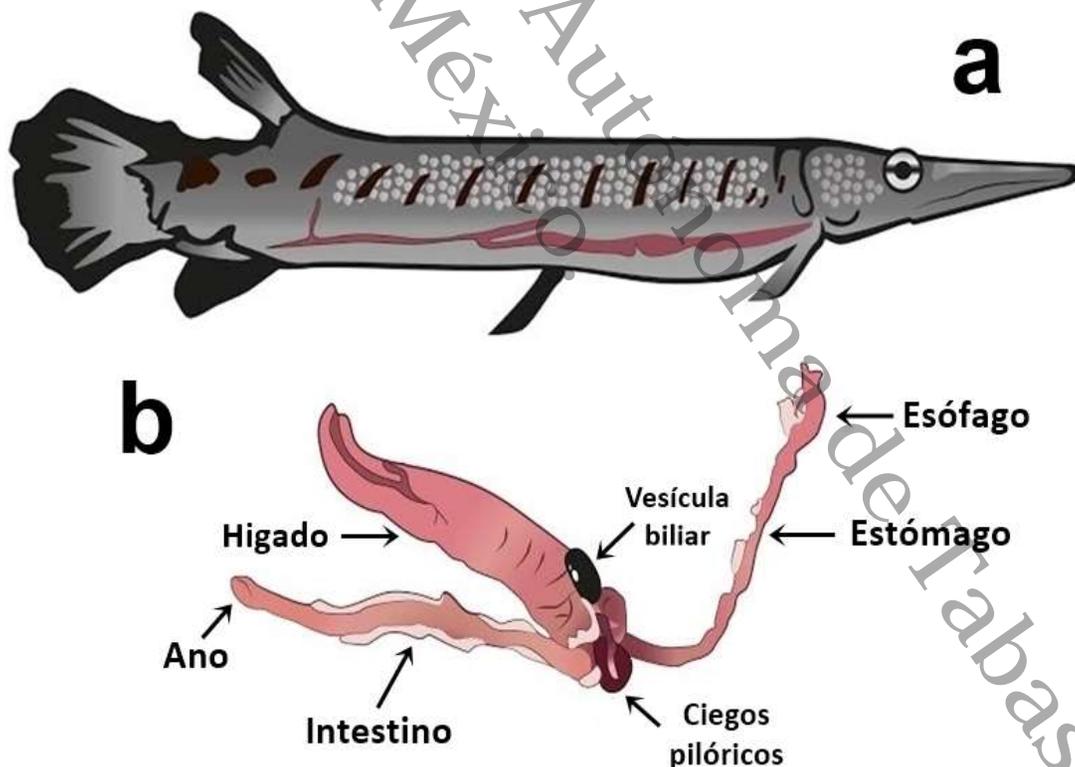


Figura 1. Sistema digestivo del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). a) Localización anatómica, b) Vista dorsal. Diseñado por Nájera *et al.*, (2017).





La estructura de la mucosa del sistema digestivo es complejo y consiste en la combinación del epitelio intestinal, células inmunes y microflora (McCracken y Lorenz, 2001). El espesor, la composición y el efecto protector de la capa de las mucosas, son establecidas por el equilibrio dinámico entre proceso opuesto anabólico (síntesis y secreción de las células caliciformes) y catabólico (degradación física y proteolítica).

Las mucinas se distinguen por la presencia de O-glicosilación en la serina aminoácidos y treonina, agrupadas en “dominios de mucina”. Estos dominios de mucina se producen por células caliciformes del epitelio, donde ayudan a contener bacterias comensales en el lumen del intestino mediante la prevención de adhesión a células epiteliales (Cao y Wang, 2009). Las mucinas se almacenan en gránulos situados apicalmente de células caliciformes y se secretan a una velocidad basal lenta para mantener la capa de mucus sobre el epitelio. El mucus y las bacterias comensales, al interactuar entre sí, mantienen la homeostasis intestinal, la salud y defensa de patógenos (Salinas, 2015).

2.1 Prebióticos

Los prebióticos, son ingredientes no digeribles que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de una bacteria benéfica a un grupo de ellas en el sistema digestivo (Gibson y Roberfroid, 1995). Según Rosado y Ondarza (2003), un ingrediente alimenticio considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios: No debe ser hidrolizado u absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal (Minozzo, 2002). Ser un sustrato selectivo tanto para una o varias bacterias comensales benéficas al intestino, que son estimuladas en su crecimiento y metabólicamente activadas. Alterar la flora a favor de una composición más saludable e inducir efectos sistémicos o lumbinales que sean benéficos para la salud del huésped.





La función de los prebióticos es el cambio total de la comunidad microbiana a uno dominado por bacterias benéficas (Manning y Gibson, 2004). La reacción a este cambio es la alteración de la fermentación del intestino y como consecuencia las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta volátiles y la abstención de la colonización de patógenos (Burr, 2008), donde tracto gastrointestinal es un puerto de entrada potencial para algunas bacterias patógenas y ayuda a mejorar la respuesta inmune no específica, la acumulación de minerales y el rendimiento del pez. Los principales prebióticos son: Fructo-oligosacáridos (FOS), los Fructo-oligosacáridos de cadena corta (scFOS), Galacto-oligosacáridos (GOS), Xilo-oligosacáridos (XOS), Arabinxilano-oligosacáridos (AXOS), Isomalto-oligosacáridos (OMI) y Manano oligosacáridos (MOS), este último es el más estudiado en especies de importancia económica.

2.2 Importancia del uso de los Manano oligosacáridos (MOS) en las dietas.

El Mos, se asocia a la adhesión intestinal de bacterias mediante el uso de componentes que resisten el paso a lo largo del intestino durante la digestión y se asimilan los grupos de carbohidratos específicos en las células intestinales. Este mecanismo favorece la presencia de una microbiota benéfica y como consecuencia una alta remoción de las heces y la reducción en la incidencia y severidad de posibles enfermedades (Abu-Elala *et al.*, 2013).

Los oligosacáridos son hidratos de carbono simples que contienen de nueve a cincuenta y siete monosacáridos. Dichos carbohidratos cumplirían roles inmunológicos y nutricionales en los organismos (Franklin *et al.*, 2005). El Mos es un azúcar natural derivado de la otra pared celular de una cepa selecta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente compuesto por manano oligosacáridos. La forma de acción se basa en dos funciones principales: 1) bloquea la colonización de patógenos y 2) modula el sistema inmune.





Los hidratos de carbono interactúan con la superficie celular debido a la adhesión de las bacterias a moléculas receptoras en la superficie celular por grupos de carbohidratos específicos. El Mos constituye una fuente rica de manosa y al ser utilizada en las dietas constituye componentes que el animal no puede digerir o que el sistema digestivo no es capaz de asimilar ya que carece de las enzimas necesarias para hacerlo y se les denomina prebióticos (Gibson, 1999). Sin embargo, sirve como sustrato para el crecimiento de bacterias benéficas, como las *Bifido-bacterias* y *Lactobacillus spp.*

Los patógenos tienen la capacidad de unirse a MOS, a través de la unión lectina a manosa (MBL), en lugar que a las vellosidades intestinales. Esta unión impide la proliferación de las bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Clostridium perfringens*), esto ayuda a minimizar la incidencia o gravedad de la enfermedad (Uribe *et al.*, 2011). Efectos significativos se han demostrado en especies de importancia económica, como la lubina *Dicentrarchus labrax* (Torrecillas *et al.*, 2007, 2012), trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Staykov *et al.*, 2007a; Yilmaz *et al.*, 2007 y Rodríguez *et al.*, 2008); tilapia del nilo *Oreochromis niloticus* (Samrongpan *et al.*, 2008), lenguado *Paralichthys olivaceus* (Ye *et al.*, 2011) y la dorada *Sparus aurata* (Gültepe *et al.*, 2011).





III. JUSTIFICACIÓN

La alimentación juegan un papel importante en la salud de los peces en todas las etapas del cultivo, donde presentan enfermedades de importancia, donde las consecuencias pueden ser de leves hasta causar la muerte masiva de la producción, debido a estas problemáticas se ha recurrido a buscar alternativas biotecnológicas, fisiológicas y genéticas que durante su aplicación puedan producir efectos favorables para incrementar la producción, ya que de los costos totales, el 40-60% corresponden al costo de alimentación y el 10% al control y prevención de enfermedades.

El uso inapropiado de los antibióticos y sustancias químicas, para el control de enfermedades en los peces, pueden convertirse en un problema de salud pública; ya que la mayoría de antibióticos usados tienen un tiempo de retiro muy largo, es decir permanece mucho tiempo en el pez. Estas sustancias pueden ingresar al organismo humano por la ingesta de carne de pescado que haya sido sometido a tratamientos terapéuticos (Merrifield y Ringo, 2014).

Por tal motivo, las investigaciones que se realizan en especies con cultivos completos y tecnológicas desarrolladas en distintos sistemas de producción, buscan la optimización de los procesos y las mejores estrategias de alimentación en las distintas etapas del cultivo a fin de obtener organismos saludables y que contribuyan ante un producto de alta calidad para los consumidores y una mayor productividad a menor costo.

Una de las alternativa para evitar el uso de antibióticos en los cultivos, son los prebióticos, debido a que son ingrediente no digerible que afecta benéficamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de una bacteria benéfica a un grupo de ellas en el sistema digestivo (Gibson y Roberfroid, 1995).





Evaluación del Manano-oligosacáridos (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractostzus tropicus*).

La eliminación de las colonizaciones bacterianas, estimula la respuesta inmune, maximiza la ganancia de peso, la conversión alimenticia y tolerancia al estrés. Debido a esto el Manan oligosacáridos (MOS) ha sido empleado en varias especies comerciales; sin embargo, se desconoce su comportamiento en el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).





IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

- Evaluar el efecto de diferentes niveles Manan oligosacáridos (MOS), en dietas balanceadas para alimentación de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).

4.2 Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de diferentes niveles de Manan oligosacáridos (MOS) sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).
- Evaluar el efecto de diferentes niveles Manan oligosacáridos (MOS) sobre la actividad de enzimas digestivas (proteasas, lipasas, amilasas y fosfatasas) de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).





V. LITERATURA CITADA

- Abu-Elala, N., Marzouk, M., Moustafa, M. (2013). Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 1(1), 21–29 pp.
- Anderson, (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Rev. Fish Dis.* 2, 281-307 pp.
- Burr, G., Hume, M., Ricke, S., y Gatlin III, D. M. (2008). Evaluation of GroBiotic-A, brewer's yeast and fructooligosaccharide as prebiotics for the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture América*, Las Vegas, N. V.
- Caceres, B. M., Masumoto, T., Galindo, V. J., Hosokawa, H., (2004). Efecto del levamisol mediante administración oral en la actividad de la respuesta inmune innata en juveniles de lenguado Japonés (*Paralichthys olivaceus*). En: Comunicación científica civa 2004. (<http://www.civa2004.org>), p. 625-634 pp.
- Cao, X. J. y Wang. W. M., (2009). Histology and Mucin Histochemistry of The Digestive Tract of Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anat. Histol. Embryol.* 38:254-261.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A. Meseguer, J. y Esteban, M. A. (2012b). Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream *Sparus aurata* L. did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish Shellfish Immunol.* 32:1032–1040 pp.
- Dalmo, R, Bøgwald, J., (2008). β -glucans as conductors of immune symphonies. Review. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 384-396 pp.
- Franklin, S., Newman, K. y Meek, K. (2005). Immune parameters of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. *Journal of Dairy Science* 88: 766-775 pp.
- Gatlin, D. M. y Li, P., III. (2004). Dietary brewer's yeast and the prebiotic





- GroBiotic® -A influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus inane* infection. *Aquaculture* 231, 445-456 pp.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*; 125: 1401-12 pp.
- Gibson, G. R., (1999). Modulación dietética de la microflora intestinal humana utilizando los prebióticos oligofructosa e inulina. *J Nutr*; 129: 1438S-1441S.
- Gültepe, N., Salnur, S., Hossu, B. y Hisar, O., (2011). Dietary supplementation with mannan oligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquac Nutr*; 17:482- 487 pp.
- Manning, T. S. y Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 287-298 pp.
- McCracken, V. J. y Lorenz, R. G. (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity, and microbiota. *Cell Microbiol*; 3: 1-11 pp.
- Merrifield, D. L. y Ringo, E. (2014). *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. Wiley-Blackwell Publisher, 488 pp.
- Minozzo, G. (2002). *Avances en nutrición y alimentación animal*. 2da. ed. Madrid, España. Edit. Universidad Polytechnic de Madrid. 89-106 pp.
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J. y Sarasquete, M. C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 121-130 pp.
- Nájera Arzola, I. C., (2017). Evaluación del Manano oligosacáridos (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractostezus tropicus*). Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 43 pp.
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. y Sweetman, J., (2008). Studies of the effects of mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis*,





- and poly hydrobutyricacid as immune stimulant and growth promoting ingredients in rainbow trout diets. In: 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan. Abstract 2d-1-5, 158 pp.
- Romalde, J. L., Luzardo-Álvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A. E., Blanco-Méndez, J. (2004). Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*; 236:119-129 pp.
- Rosado Loria, Jorge y Ondarza Benéitez, Mauricio, (2003). Prebióticos y probióticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición. *Nutran el portal de la alimentación*.
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. y Sweetman, J., (2008). Studies of the effects of mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis*, and poly hydrobutyricacid as immune stimulant and growth promoting ingredients in rainbow trout diets. In: 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan. Abstract 2d-1-5, 158 pp.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of Teleost Fish. *Biology* 4: 525 – 539 pp.
- Samrongpan, C., Areechon, N., Yoonpundh, R. y Sirsapoome, P., (2008). Effects of manna oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus Linnaeus*) fry. In: International symposium on tilapia in aquaculture, 345-353 pp.
- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. y Sweetman, J., (2007). Effect of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*. v.15, 153-161 pp.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L. y Real, F., (2007). Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol*; 23: 969-981 pp.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Dhanasiri, A. K. S. y Sweetman, J., (2012). Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS)





- after *Vibrio anguillarum* exposure. J. Fish Dis; 35: 591-602 pp.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. y Morán, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina, 56(10), 486–503.
- Vandenberg, G. W. (2004). Oral vaccine for finfish: academic theory or comercial reality?. Anim Health Res Rev. 5: 301-304 pp.
- Volpatti, D., D'Angelo, L.; Jeney, G.; Jeney, Z.; Anderson, D.P.; Galeotti, M., (1998). Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. J. Appl. Ichthyol., v.14, 201-206 pp.
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D.P., Ayabe. T., López-Boado, Y. S., Stratman, J. L, Hultgren, S. J, Matrisian, L. M., Parks, W. C., (1999). Regulation of intestinal alpha-defensing activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Science; 286: 113-117 pp.
- Ye, J. D., Wang, K., Li. F. D. y Sun, Y. Z., (2011). Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac Nutr; 17: 902-911 pp.
- Yilmaz, E., Genc, M. A. y Genc, E., (2007). Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Isr J Aquac; 59:182-188 pp.





VI. Artículo en extenso

Evaluación del Manano oligosacáridos (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractostezus tropicus*)

Nájera-Arzola, I.C.¹, Álvarez-González, C.A.^{1*}, Frías-Quintana, C.A.¹, Peña, E.^{1,3}, Martínez-García, R.¹, Camarillo-Coop, S.¹, Méndez-Marín, O.¹, Gisbert, E²

¹ Laboratorio de Acuacultura, UJAT-DACBIOL. Carretera Vhsa-Cárdenas s/n, Km. 0.5, Entronque Bosques de Saloya, 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

**autor de correspondencia: alvarez_alfonso@hotmail.com

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Centre de Sant Carles de la Ràpita, Crta. Poble Nou del Delta km 5.5, 43540, Tarragona, España.

³CONACYT, CDMX

Resumen

Los prebióticos, son ingredientes no digeribles que benefician al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de bacterias benéficas en el sistema digestivo. La eliminación de las colonias de bacterias patógenas, estimula la respuesta inmune, maximiza la ganancia de peso, la conversión alimenticia y tolerancia al estrés. El Manan oligosacárido (MOS) ha sido empleado en varias especies de importancia comercial por lo que nuestro estudio tiene como





objetivo determinar el efecto de los diferentes niveles de MOS en dietas balanceadas para juveniles de *A. tropicus*. Se diseñó un experimento simple completamente aleatorizado con seis tratamientos, se evaluaron por triplicado, empleando diferentes porcentajes de MOS (0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%) y una dieta control de trucha (DCo). Se seleccionaron 180 juveniles (5.11 ± 0.08 g, 11.29 ± 0.06 cm), se distribuyeron en un sistema de recirculación. La supervivencia en todos los tratamientos fue del 100%, mientras que la dieta 0.2% MOS presentó los valores más altos en ganancia absoluta en peso (AWG: 20.47), razón de eficiencia proteínica (PER: 1.26), tasa específica de crecimiento (SGR: 2.71) y ganancia en peso (DWG: 0.34), además se presentaron las mayores actividades enzimáticas digestivas (tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasa, amilasa, carboxipeptidasa A y fosfatasa alcalina). Estos resultados indican que las dietas con 0.2% de MOS puede ser considerada como un suplemento dietético beneficioso para mejorar el crecimiento y la capacidad digestiva de los juveniles de *A. tropicus*.

Palabras clave: Prebióticos, Manano oligosacáridos, crecimiento, *Atractosteus tropicus*.

Introducción

La acuicultura busca la optimación de los procesos y las mejores estrategias de alimentación con fin de obtener organismos saludables. Por tal motivo, la alimentación como el estado de salud de los peces juegan un papel importante en todas las etapas del cultivo, es donde presentan enfermedades de mayor importancia y las consecuencias pueden ser de leves hasta causar la muerte





masiva de la producción, debido a estas problemáticas se ha recurrido a buscar alternativas que puedan producir efectos favorables para incrementar la producción, ya que de los costos totales, el 40-60% corresponden al costo de alimentación y el 10% al control y prevención de enfermedades (Uribe *et al.*, 2011).

El uso inapropiado de los antibióticos y sustancias químicas, para el control de enfermedades en los peces, pueden convertirse en un problema de salud pública; ya que la mayoría de antibióticos usados tienen un tiempo de retiro muy largo, es decir permanece mucho tiempo en el pez. Estas sustancias pueden ingresar al organismo humano por la ingesta de carne de pescado que haya sido sometido a tratamientos terapéuticos (Merrifield y Ringo, 2014).

Gatlin y Li (2004), define como alimentación funcional a elaborar una dieta con un balance nutricional, suplementarla con aditivos, suministrar y que promueva la salud y la resistencia a enfermedades en los cultivos de peces. Por lo que se ha permitido emplear estrategias de alimentación tales como la suplementación en las dietas de inmunoestimulantes, probióticos, prebióticos y simbióticos. Los inmunoestimulantes son sustancias naturales o sintéticas capaces de modular la respuesta inmune del animal (Anderson, 1992). Los probióticos son microorganismos vivos (Gibson y Roberfroid, 1995), al ser adicionados en la dieta ejercen un efecto benéfico para el sistema digestivo del animal. Los prebióticos, son ingrediente no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de una bacteria benéfica a un grupo de ellas en el sistema digestivo. Se definen como simbióticos a la combinación de





probióticos (microorganismos vivos) y prebióticos (ingredientes no digeribles) que afectan positivamente al hospedero, mejorando la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de la dieta en el sistema digestivo (Gibson y Roberfroid, 1995). La eliminación de las colonizaciones bacterianas, estimula la respuesta inmune, maximiza la ganancia de peso, la conversión alimenticia y tolerancia al estrés. Efectos significativos se han demostrado en especies de importancia económica, como la lubina *Dicentrarchus labrax* (Torrecillas *et al.*, 2007, 2012), trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Staykov *et al.*, 2007a; Yilmaz *et al.*, 2007 y Rodríguez *et al.*, 2008); tilapia del nilo *Oreochromis niloticus* (Samrongpan *et al.*, 2008), lenguado *Paralichthys olivaceus* (Ye *et al.*, 2011) y la dorada *Sparus aurata* (Gültepe *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de MOS como prebiótico en la nutrición de peces está limitado por la composición de la dieta, el tiempo del experimento, las condiciones del cultivo, la especie, la edad y la condición de estrés (Volpatti *et al.*, 1998). Por tal motivo, este estudio se propuso a determinar los efectos de los diferentes niveles de suplementación de MOS en crecimiento, supervivencia y actividad de enzimas digestivas de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).

Materiales y métodos

Obtención de los juveniles

Los ejemplares se obtuvieron de un desove inducido de reproductores (1 hembra 3.5 kg de peso promedio y 3 machos 1.5 kg de peso promedio) mediante una





inyección intramuscular de la hormona LHRHa ($35 \mu\text{g kg de pez}^{-1}$) en la aleta pélvica y que se mantuvieron en tanques circulares de 2 000 L (0.6 m de alto por 2 m de diámetro). Los reproductores provenían de un lote que se mantiene con condiciones de cautiverio en el Laboratorio de Acuicultura Tropical en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBIOL- UJAT). Posterior al desove (16 horas post-inducción), los reproductores se retiraron de las tinas, la incubación, la eclosión y desarrollo de las larvas ocurrieron en el mismo tanque de desove fueron adaptados al consumo de alimento balanceado y después de 30 días se colectaron 360 juveniles de *A. tropicus*.

Diseño experimental

Se diseñó un bioensayo de una vía simple completamente aleatorizado con seis tratamientos, los cuales se evaluaron por triplicado, empleando diferentes niveles de inclusión de manano oligosacárido (0%, 0.2%, 0.4%, 0.6% y 0.8% MOS) y alimento balanceado para trucha (Silver Cup™) como dieta control (DCo). Los peces fueron adaptados previamente al consumo de las dietas por siete días. Al iniciar el bioensayo a los ejemplares se les realizó la primera biometría. Se registró el peso (g) y su longitud (cm) de los organismos, para lo cual se colocó en primera instancia en una franela seca con el propósito de eliminar el exceso de agua, inmediatamente se midieron con un ictiómetro y se pesaron en una balanza digital portátil (Ohaus HH120, precisión $120 \pm 0.01 \text{ g}$, Shenzhen, China), las biometrías





se realizaron cada 15 días. Para este experimento se ocuparon 180 juveniles (5.11 ± 0.08 g, 11.29 ± 0.06 cm), se distribuyeron en 18 tanques circulares el volumen de agua fue de 70 L, los cuales estaban conectados a un sistema de recirculación con un reservorio de 1500 L que funciona como sedimentador de sólidos y filtro biológico, además de una bomba de agua 1 HP (Jacuzzi, JWPA5D-230A, Delavan WI, USA) y un termostatos de titanio (PSA, R9CE371, Delavan WI, USA). La calidad del agua del sistema fue monitoreada diariamente, registrando la temperatura (29.1 ± 0.8 °C), el oxígeno disuelto (5.7 ± 0.2 mg L⁻¹) mediante un oxímetro (YSI 85, Ohio, USA) y el pH (7.3 ± 0.2) con un potenciómetro (HANNA HI 991001, Romania, Europa), para mantener la calidad del agua, se realizaron recambios parciales de 50% cada dos días y recambios totales cada 5 días. Las dietas fueron proporcionadas 4 veces al día (8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 horas), se determinó el consumo de alimento por diferencia entre la cantidad de dieta suministrada de peso seco y la obtenida al secar de nuevo el alimento sobrante (que consistió en recolectar por sifón el sobrante de alimento, el cual se mantuvo en congelación). El alimento sobrante fue secado a la temperatura en que se elaboraron de dietas (pellets) en una estufa marca FISHER SCIENTIFIC MR con temperatura controlada de 60 a 70 °C.

Formulación y elaboración de dietas experimentales

La formulación de las dietas se realizó por medio del programa MIXITWIN V. 5.0, diseñando las dietas suplementadas con un prebiótico (Manano oligosacáridos),





para la dieta 0 % MOS se utilizó, la dieta propuesta por Frías-Quintana *et al.*, (2010), y para la dieta control (DCo) el alimento comercial (Silver Cup™) con 45 % de proteína y 16 % de lípidos.

En la Tabla 1, se presenta la formulación de las 5 dietas, así como su composición proximal. Para la elaboración de las dietas experimentales se siguió el protocolo propuesto por Álvarez-González *et al.*, (2001), los ingredientes se pesaron con ayuda de una balanza analítica con capacidad 2000 g (Ohaus mod. CS2000, China), se mezclaron los macronutrientes en seco durante 15 minutos utilizando una batidora industrial (Bathamex, 178716, México D. F, México). De la misma manera, se pesaron los micronutrientes (MOS, premezclas de vitaminas, minerales y vitamina C) y fueron agregados a la mezcla de los macronutrientes, mezclando por otros 15 minutos. Como consiguiente se pesaron los ingredientes líquidos (aceite de pescado y lecitina de soya) se añadieron a la mezcla anterior y se mezclaron por otros 15 minutos y por último, se agregó el agua (aproximadamente 400 ml por Kg de dieta) y realizando el mezclado final durante otros 15 minutos. La mezcla obtenida se colocó en un molino para carne 1 HP (Torrey, M-22RI, Monterrey N. L, México) para obtener pellets con una criba de 5 mm y fueron secados a 60 °C entre 12 y 24 horas en un horno (Coriat, HC-35-D, D. F, México). Las dietas fueron colocadas en bolsas de plástico selladas herméticamente y almacenadas a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

Sacrificio y toma de muestras de especímenes

Al término del bioensayo se realizó la última biometría y se tomaron 3 peces por





replica, para realizar los extractos multienzimáticos. Una vez obtenido el material biológico se colocaron en el congelador a una temperatura de 4°C por un tiempo de 5 minutos. Posterior a esto se realizó un corte en la medula espinal en la parte posterior de la cabeza de los juveniles de pejelagarto para sacrificarlos y realizar un corte en la zona ventral para facilitar la extracción de los órganos (estómago e intestino).

Índices de calidad del alimento, crecimiento y supervivencia.

El experimento tuvo una duración 62 días, donde la supervivencia se determinó por medio del conteo del total de los peces por replica. En base a los datos obtenidos de consumo y crecimiento de los juveniles *A. tropicus*; se calcularon los siguientes índices: tasa de conversión alimenticia (TCA), ganancia absoluta en peso (AWG), factor conversión alimenticia (FCR), consumo de proteína (PC), razón de eficiencia proteica (REP), tasa específica de crecimiento (SGR) y ganancia en peso (DWG) (Tabla 2).

Actividades enzimáticas

Los análisis de la actividad de enzimas digestivas, se realizaron con macerando los tejidos en agua destilada (en relación de 30 mg de tejido en base húmeda ml⁻¹). Todas las muestras fueron homogeneizadas en solución de Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7.5 (15 mg ml⁻¹). Dichas muestras fueron centrifugadas (14 000 g por 15 min





a 4 °C), para recuperar el sobrenadante, que fue separado en alícuotas de 500 µL y para congelarse a -80 °C. La concentración de proteína soluble se evaluó por la técnica de Bradford (1976) usando como estándar una curva patrón de albúmina bovina sérica. Para la determinación de la actividad de tipo proteasa ácida (pepsina) se utilizó el método de Anson (1938) usando como sustrato hemoglobina (0.5%) en una solución tampón Glicina-HCl 100 mmol l⁻¹ a pH 2.

La proteasa alcalina fue medida con la técnica de Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 10 mmol l⁻¹ a pH 9. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 180 minutos, se detuvo la reacción por adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA, 20 %), se centrifugo a 14 000 rpm durante 15 minutos y la absorbancia de los productos de reacción se midió a 280 nm. La unidad de actividad enzimática fue definida como 1 µg de tirosina liberada por minuto, esto con base en el coeficiente de extinción molar (0.005).

La actividad de tripsina fue identificada por el método de Erlanger et al. (1961) a 37 °C usando como sustrato BAPNA (Nα-Benzoil-DL-Arginina-P-nitroAnilida) disuelta en el tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 10 mmol l⁻¹ a pH 8.2, y se midió a 410 nm. La actividad quimotripsina fue determinada por el método de DelMar et al. (1961) usando como sustrato BTEE (N-benzoil-L-tirosina etil ester) 5mM en buffer Tris-HCl 44.4 mM + CaCl₂ 55.5 mM pH 7.8, el sustrato fue previamente diluido en 200 µl de DMSO. Se colocó 623 µl de buffer directamente en la celda de cuarzo del espectrofotómetro y se calibro a cero, posteriormente se agregó 70 µl del sustrato y se midió la absorbancia a 256 nm cada 20 s durante 2 min.





transcurrido este tiempo se agregó 40 μ l de extracto multienzimático y nuevamente se midió la absorbancia cada 20 s por 2 min. El ensayo se realizó por triplicado; el delta de absorbancia se calculó con la diferencia entre la absorbancia de la reacción catalizada y la absorbancia del sustrato una vez que ambos se estabilizaron.

La actividad leucina aminopeptidasa se determinó por el método de Maraux et al. (1973) utilizando como sustrato leucina p-nitroanilida (0.1 mmol l^{-1}) en DMSO usando tampón fosfato sódico 50 mmol l^{-1} a pH 7.2 a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, medida a 410 nm.

La actividad Carboxipeptidasa A fue determinada a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ usando como sustrato Hyppuryl-L-phenyl-alanine (25 mmol l^{-1}) en una solución tampón de Tris-HCl 50 mmol l^{-1} , NaCl 25 mmol l^{-1} , a pH 7.5 y medido a 254 nm (Folk y Schirmer 1963).

Las reacciones de estas técnicas fueron detenidas con ácido acético al 30%; siendo definida la actividad enzimática como 1 μ mol de nitroanilida liberada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar de tripsina (8.8), de quimotripsina y leucina aminopeptidasa (8.2).

La actividad α -amilasa se identificó usando como sustrato almidón al 2% en el tampón citrato-fosfato 100 mmol l^{-1} , NaCl 50 mmol l^{-1} , pH 7.5 con una incubación de 180 min, se medió los azúcares reductores a 600 nm, definiendo una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 μ g de maltosa por minuto (Robyt y Whelan 1968).

La actividad lipasa fue determinada con la técnica de Versaw et al. (1989), usando como sustrato β -naftil caprilato (200 mmol l^{-1}) disuelto en una solución tampón





Tris-HCl 50 mmol l⁻¹ a pH 7.2 con una solución de tauracolato de sodio (100 mmol l⁻¹), para lo cual se realizó una incubación de 15 min del extracto enzimático en el sustrato y fue detenida la reacción con TCA 0.72N. Para el revelado de la actividad se adiciono una solución de Fast blue (100 mmol l⁻¹), clarificando la reacción con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v), y se midió la absorbancia a 540 nm. La actividad lipolítica se define como 1 µg de naftol liberado por minuto.

Las actividades de fosfatasa acida y alcalina fuero medidas a 25 °C de acuerdo a la metodología de Begmeyer (1974), incubando los extractos en una solución al 2% de 4-nitrofenilfosfato en una solución amortiguadora de ácido cítrico/citrato (1:1 P/P pH 5.5, la reacción fue detenida con NaOH (0.05 N) y la absorbancia se midió a 405 nm, una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 mg de naftil por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar de 0.0185.

La actividad de los extractos se determinaron usando las siguientes ecuaciones: 1) Unidades por ml = ($\Delta_{abs} \times \text{volumen final de reacción (ml)}$) x (CEM x tiempo (min) x volumen del extracto (ml))⁻¹; 2) Unidades x mg de proteína⁻¹ = Unidades por ml/mg de proteína soluble); 3) Unidades por pez = Unidades por ml x No. de peces por ml⁻¹]. El Δ_{abs} es determinada por la longitud de onda de cada técnica y el CEM es el coeficiente de extinción molar para el producto de reacción (ml µg⁻¹ cm⁻¹).

Análisis estadístico

Se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para los datos de peso y longitud, por lo que se realizó la prueba ANOVA y la prueba a





posteriori de Tukey; por su parte, los índices de calidad del alimento y actividades de enzimas digestiva al no cumplir el supuesto de normalidad fueron analizadas con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba a posteriori de Nemenyi. Todas las pruebas se realizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI usando un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Evaluación de sobrevivencia y crecimiento

Al comparar la supervivencia de los juveniles de *A. tropicus* se obtuvo un 100% en todos los tratamientos, por lo que no existe diferencias significativas entre estos ($P > 0.05$).

Los organismos que consumieron la dieta suplementada con 0.2% MOS presentaron el mayor crecimiento con un peso total de 25.45 ± 2.77 g y una talla de 18.82 ± 0.53 cm; seguidos por los ejemplares que consumieron la dieta 0% MOS con 24.53 ± 1.35 g y 18.40 ± 0.26 cm y luego los organismos alimentados con las dietas 0.6%, 0.8% y 0.4% MOS son estadísticamente iguales y finalmente los peces alimentados con la dieta control obtuvieron el menor crecimiento con 13.07 ± 0.06 g y una talla de 15.58 ± 0.06 cm, observando diferencias significativas entre los seis tratamientos ($P < 0.05$) (Fig. 1).

Índices de calidad del alimento

Se calcularon los valores promedios del consumo de alimento para los juveniles de *Atractosteus tropicus* alimentados con dietas de Manan oligosacáridos (MOS)





durante 8 semanas (Tabla 2). Los peces que se les suministro la dieta 0% MOS presentaron un valor más alto en la tasa conversión alimenticia (TCA: 30.54). Los organismos alimentados con la dieta 0.2% MOS, presento mayor ganancia absoluta en peso (AWG: 20.47). Los peces alimentados con la dieta DCo mostraron valores más altos en el factor de conversión de alimento (FCR: 2.67). Para el consumo de proteína, la dieta que presentó valores mayores fue la dieta 0 % MOS (PC: 16.37). Los peces que se les suministro la dieta 0.2% MOS presentaron un valor más alto en razón de eficiencia proteínica (PER: 1.26), tasa específica de crecimiento (SGR: 2.71) y en ganancia en peso (DWG: 0.34).

Actividades enzimáticas

La actividad específica de la proteasa ácida (pepsina) mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), donde la mayor actividad se detectó para los juveniles que consumieron las dietas 0.6% MOS con 426.57 ± 2.99 mg proteína⁻¹, seguida de las dietas 0% y 0.4% MOS y encontrándose la menor actividad en la dieta 0.8% MOS (Tabla 3). Por su parte, la actividad de la proteasas alcalinas mostró el mayor valor para los juveniles que consumieron la dieta 0% MOS con 145.66 ± 1.82 U mg proteína⁻¹, seguida por los juveniles que consumieron la dieta 0.4% y 0.2% MOS y la menor actividad fue para los que consumieron la dieta DCo. La actividad tripsina mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), donde los juveniles alimentados con la dieta 0.2% y 0% MOS tuvieron la mayor actividad, seguida de la dieta 0.4% MOS y encontrándose la menor actividad enzimática en la dieta DCo. Para la actividad de quimotripsina, mostró diferencias significativas ($P < 0.05$),





donde los juveniles que se alimentaron con la dieta 0% MOS tuvieron la mayor actividad, seguidas de los alimentados con la dieta 0.4% y 0.2 % MOS y luego los alimentados con las dietas DCo y 0.6% MOS y finalmente las que tuvieron la menor actividad fueron las que consumieron la dieta 0.8% MOS. La actividad específica de leucina-aminopeptidasa mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$) donde la mayor actividad fue para los juveniles alimentados con las dietas 0.2% MOS, seguida de las dietas DCo y 0.8 % MOS, luego los organismos alimentados con las dietas 0.6% y 0.4% MOS y la menor actividad enzimática la presentaron organismos que consumieron las dietas y 0% MOS. En cuanto a la actividad específica tipo lipasa se detectó una muy baja actividad en los juveniles alimentados con los 0.4% MOS y DC o, registrándose la mayor actividad para los juveniles alimentadas con el 0.2 % MOS, siendo estadísticamente mayor ($P < 0.05$) que resto de los tratamientos. En el caso de la actividad específica de la α -amilasa se observó una mayor actividad para los juveniles alimentados con la dieta 0.2% MOS, seguidas por la dieta 0% MOS y luego los organismos que consumieron las dietas 0.4%, 0.6% y 0.8% MOS, encontrándose una menor actividad en la dieta DCo. La actividad carboxipeptidasa A, también mostró diferencias estadísticas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$) donde se presentó la mayor actividad para los juveniles alimentados con las dietas 0.2% y 0% MOS, seguidas de los peces alimentados con la dieta 0.4 % MOS, luego los alimentados con la dieta 0.8% y 0.6% MOS y finalmente la dieta que tuvo menor actividad fueron la dieta DCo. En cuanto a la actividad de fosfatasa ácida para los juveniles que consumieron las dietas 0%, 0.6% y 0.2% MOS, presentaron





una mayor actividad a diferencia de los alimentados con la dieta DCo. Por último para la actividad de fosfatasa alcalina para los juveniles que consumieron las dietas 0.6% MOS y DCo, presentaron una menor actividad a diferencias ($P < 0.05$) del resto de los tratamientos.

Discusión

Los parámetros fisicoquímicos evaluados se mantuvieron estables y dentro del rango de confort del pejelagarto (Aguilera *et al.*, 2008). De acuerdo con los resultados obtenidos en la tasa de supervivencia presentó cambios positivos en la inclusión del MOS en las dietas, resultados similares, se reportaron en otras especies como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Staykov *et al.*, 2007), larvas de cobia (*Rachycentron canadum*) (Salze *et al.*, 2008), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Torrecillas *et al.*, 2007) y en la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus x O. aureus* (Genc *et al.*, 2007).

Los juveniles de *A. tropicus* presentaron mayor crecimiento con la dieta suplementada 0.2% MOS, sin embargo la misma dosis en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Welker *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2010), no promueve efectos significativos, atribuibles a la baja influencia del MOS sobre capacidad de absorción en el sistema digestivo. Según Silva y Nörnberg (2003), la acción de los pre y probióticos dependen en mayor o menor medida de la acción de la capacidad digestiva del organismo y por consecuencia la actividad de las enzimas digestivas puede verse afectada durante la hidrólisis de los componentes e





impedir la digestión, la asimilación y en consecuencia disminuir la tasa de conversión alimenticia y el crecimiento.

Sin embargo, los juveniles de *A. tropicus* la dieta suplementada de 0.2% MOS, presento los valor más alto en relación a la ganancia absoluta en peso (AWG), la tasa de eficiencia proteínica (PER), la tasa específica de crecimiento (SGR) y la ganancia en peso (DWG). En este aspecto, García (2008), demostró en la tilapia del Nilo que el uso de prebióticos, eleva la ganancia de peso (DWG) y la tasa de específica de crecimiento (SGR), lo que de acuerdo a Genc *et al.*, (2007) y Peterson *et al.*, (2010) es un indicativo de que el prebiótico actuó positivamente sobre tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y en la ganancia en peso (DWG) (Zhou *et al.*, 2010). Por su parte, Schwarz *et al.* (2010) y Hisano *et al.*, (2008) justifican la mejora de rendimiento en los peces para la menor concentración de MOS, debido a que la menor adición en la dieta causa una mayor retención del paso del bolo, lo que permite una mejor digestión y absorción de nutrientes. Lo anterior concuerda con García *et al.*, (2009), Silva y Nörnberg (2003), y Schwarz *et al.*, (2010), quienes mencionan que las proteínas son más aprovechadas por los peces que consumen dietas con MOS, debido a que contribuyen a una mayor eficiencia de absorción en el sistema digestivo, particularmente en el intestino, por acción del prebiótico, lo que promueve efectos positivos debido a la reducción en el crecimiento de bacterias indeseables y mayor adición de bacterias benéficas las cuales a su vez incrementan la producción de ácidos grasos de cadena corta para alcalinizar el intestino e inducir al aumento





hipertrofia de los enterocitos en la mucosa intestinal lo que aumenta la superficie de hidrólisis y absorción de nutrientes.

Según Plumb (1999) menciona que existe una relación entre condiciones ambientales, factores biológicos y prácticas de manejo en la acuicultura que influyen en los brotes de enfermedades infecciosas y de salud en los peces. Debido a esto, no todos los prebióticos muestran tan alta eficacia en su rendimiento (Lima *et al.*, 2003). En este mismo sentido, Loddi *et al.*, (2003), indican que de acuerdo a las condiciones ambientales puede presentarse cierto estrés en los animales, lo que puede interferir con los posibles efectos benéficos del prebiótico. De esta manera, cuando el organismo se ve beneficiado por el prebiótico, éste estimula al hospedero selectivamente, mejorando el crecimiento y/o actividad de uno o más grupos de bacterias en el colon (Gibson y Roberfroid 1995). Por su parte, el manan oligosacáridos son compuestos no degradados por las enzimas digestivas y sólo ciertos microorganismos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* pueden utilizarlo para obtener energía. Es así, que las actividades enzimáticas digestivas, no se ven afectadas y permiten mantener al pez la capacidad para degradar los nutrientes del alimento (Furne *et al.*, 2005).

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que con la dieta suplementada de 0.2% de Manan oligosacárido (MOS) puede ser considerada como un suplemento dietético beneficioso para obtener un mayor crecimiento y





supervivencia, asimismo, se promueve un incremento en las actividades enzimáticas digestivas, lo cual es un indicador del aumento en la hidrólisis de los alimentos en los juveniles de *A. tropicus*.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado, mediante la beca nacional para estudios de Maestría (CVU 666819) y beca para mi estancia de investigación internacional (Becas Mixtas). Al proyecto denominado "Fortalecimiento de la Maestría en Ciencias Ambientales para su permanencia en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT" Clave: TAB-2014-C29-245836" por el apoyo para la realización de la estancia de investigación en el Institut D'investigació Agroalimentària de la Generalitat de Catalunya (IRTA, España).

Referencias

- Aguilera, C., Mendoza, R., Montemayor, J. (2008). Capacidad proteolítica digestiva en larvas de peces lepisosteidos. México, Universidad Autónoma de Nuevo León. Consultado 12 feb. 2017. Disponible en <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee82008/documentos/A031.pdf>.
- Álvarez-González, C. A., Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J. L., Dumas, S., Moreno-Legorreta, M. y Grayeb-Del Alamo, T. (2001). Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand





- bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. Aquaculture 194, 151-159 pp.
- Anderson, (1992). Inmunoestimulantes, adyuvantes y portadores de vacunas en peces: aplicaciones a la acuicultura. Anual Rev. Pescado Dis. 2, 281 - 307.
- Anson, M. L., (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J Gen Physiol 22: 79–89 pp.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248–254 pp.
- Bergmeyer, H. U. (1974). Phosphatases: Methods of enzymatic analysis, Vol 2. Academic Press, New York, 1196-1201 pp.
- Del Mar, E. G., Largman, C., Brodrick, J. y Geokas, M., (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal Biochem 99:316–320 pp.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys 95:271-278 pp.
- Frías-Quintana, C.A., Álvarez-González, C.A. y Márquez-Couturier, G. (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. Universidad y Ciencia. 26(3): 265-282 pp.
- Folk, J., y Schirmer, E. (1963). The porcine pancreatic carboxypeptidase A System. I. Three forms of the active enzyme. J. Biol Chem 238: 38–84 pp.
- Furné, M., Hidalgo, M. C., López, A., García, G. M., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, E. J. y Sanz, A. (2005). Digestive enzyme activities in Adriatic





- sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250, 391-398 pp.
- Gatlin, D. M. y Li, P., III. (2004). Dietary brewer's yeast and the prebiotic GroBiotic® -A influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture* 231, 445-456 pp.
- García, F. 2008. Suplementación alimentaria con beta-glucan y manan oligosacárido para tilapias del Nilo en tanques-red. Tesis de doctorado en acuicultura. Caunesp. Unesp. Jaboticabal. 100 pp.
- Garcia, F., Abimorad, E. G. y Schalch, S. H. C., (2009). Desempenho produtivo de tilápias-do-nilo alimentadas com suplemento alimentar à base de algas. *Bioikos*. 23, 83-89 pp.
- Genc, M.A., Yilmaz, E., Genc, E. y Aktas M. (2007). Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Isr J Aquac*; 59: 6-10 pp.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 125: 1401-1412 pp.
- Gültepe, N., Salnur, S., Hossu, B. y Hisar, O., (2011). Dietary supplementation with mannan oligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquac Nutr*; 17: 482-487 pp.





- Hisano, H.; Barros, M.M.; Pezzato, L. E. (2007). Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, 33(1), 35-42 pp.
- Lima, E. T. (2003). Avaliação da atividade inibitória *in vitro* de bacteriocinas extraídas de *Lactobacillus* spp. Isolados de aves (*Gallus gallus*, 1758). Teses Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Brasil.
- Loddi, M. M. (2003). Probióticos, prebióticos e acidificantes orgânicos em dietas para frangos de corte [tese]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista.
- Maraux, S., Louvard, D. y Baratti, J. (1973). The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. Acta Biochim Biophys Sin 321: 282–295 pp.
- Merrifield, D. L. y Ringo, E. (2014). Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics. Wiley-Blackwell Publisher, 488 pp.
- Peterson, B.C., Bramble, T. C. y Manning, B. B. (2010). Effects of Bio-Mos on growth and survival of channel catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. J World Aquac Soc; 41: 149-155 pp.
- Plumb, J.A. (1999). Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: The Iowa State University Press. 328 pp.
- Robyt, J. F. y Whelan, W. (1968). Amylases. In: Radley JA (Ed) Starch and its Derivates. Chapman and Hall, England, pp 430-476.
- Rodrigues-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. y Sweetman, J., (2008). Studies of the effects of mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis*,





- and poly hydrobutyricacid as immune stimulant and growth promoting ingredients in rainbow trout diets. In: 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan. Abstract 2d-1-5, 158 pp.
- Samrongpan, C., Areechon, N., Yoonpundh, R. y Sirsapoome, P., (2008). Effects of manna oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus Linnaeus*) fry. In: International symposium on tilapia in aquaculture, pp. 345-353 pp.
- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., Sweetman, J. (2007). Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Int* 15: 153-161 pp.
- Salze, G., McLean, E., Schwarz, M. H. y Craig, S.R. (2008). Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture* 274:148 - 152 pp.
- Schwarz, K. K., Furuya, W. M., Marçal Natali, M. R., Gaudezi, M. C., Alves Gonçalves de Lima P. (2010). •Mananoligosacárido e dietas para juveniles de tilápia do Nilo. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*v. 32(2), 197 - 203 pp.
- Silva, L. P. y Nörnberg, J. L. (2003). Prebióticos en la nutrición de no rumiantes. *Ciencia Rural*, 33 (4), 55 - 65 pp.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M. S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol* 23: 969-981 pp.





- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Dhanasiri, A. K. S. y Sweetman, J., (2012). Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *J. Fish Dis*; 35: 591-602 pp.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Morán, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*, 56 (10), 486–503 pp.
- Versaw, W., Cuppett, S. L., Winters, D. D., Williams, L. E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54: 232-254 pp.
- Volpatti, D., D'Angelo, L.; Jeney, G.; Jeney, Z.; Anderson, D.P. y Galeotti, M., (1998). Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *J. Appl. Ichthyol.*, v. 14, 201-206 pp.
- Welker, T. L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R. y Klesius, P. H. (2007). Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *J World Aquac Soc* 38: 24-35 pp.
- Walter, H. E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.J. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, Verlag Chemie. Weinham. 270-277 pp.
- Ye, J. D., Wang, K., Li. F. D. y Sun, Y. Z. (2011). Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, body composition, digestive enzyme activity, innate immune





- response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac Nutr; 17: 902-911 pp.
- Yilmaz, E., Genc, M. A. y Genc E., (2007). Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Isr J Aquac; 59: pp. 182-188 pp.
- Zhou, Q. C., Buentello, J. A., Gatlin III, D. M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 309: 253 e 257 pp.





Lista de figuras

Figura 1. Crecimiento en peso ($g \pm DE$) y longitud ($cm \pm DE$) de los juveniles alimentados con las dietas suplementadas con Manan oligosacáridos (MOS).

Lista de tablas

Tabla 1. Formulación de dietas experimentales utilizadas para el cultivo de juveniles de *A. tropicus*.

Tabla 2. Índices de crecimiento en juveniles de *Atractosteus tropicus* alimentados con dietas de Manano oligosacáridos (MOS), durante 8 semanas.

Tabla 3. Actividad enzimática de juveniles de *Atractosteus tropicus* alimentados con dietas de Manano oligosacáridos (MOS).





Evaluación del Manano-oligosacáridos (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractostzus tropicus*).

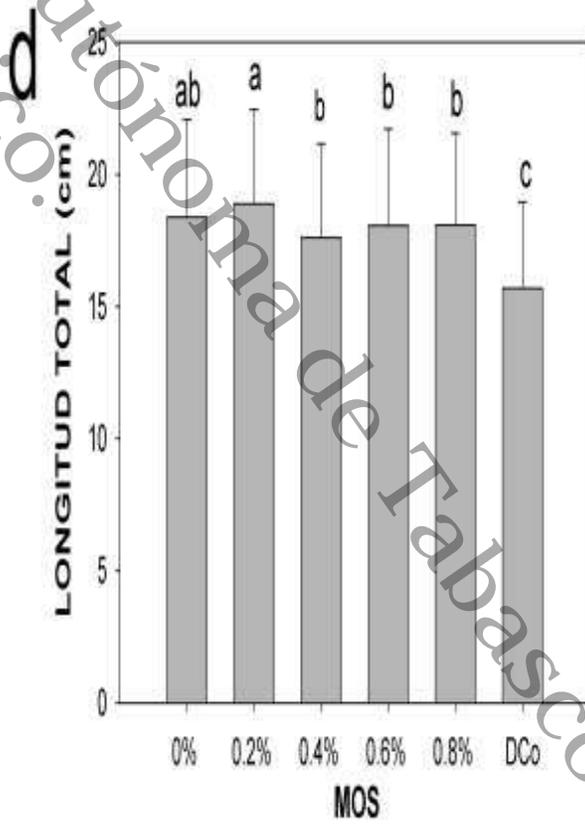
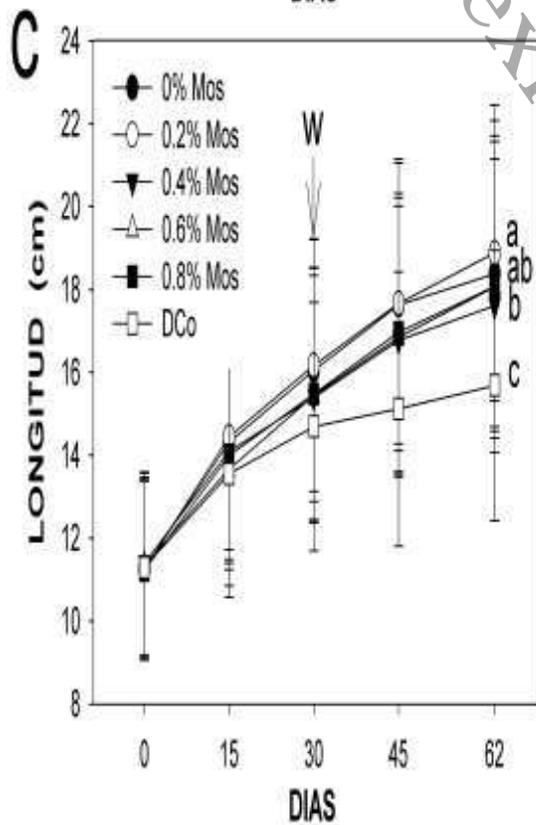
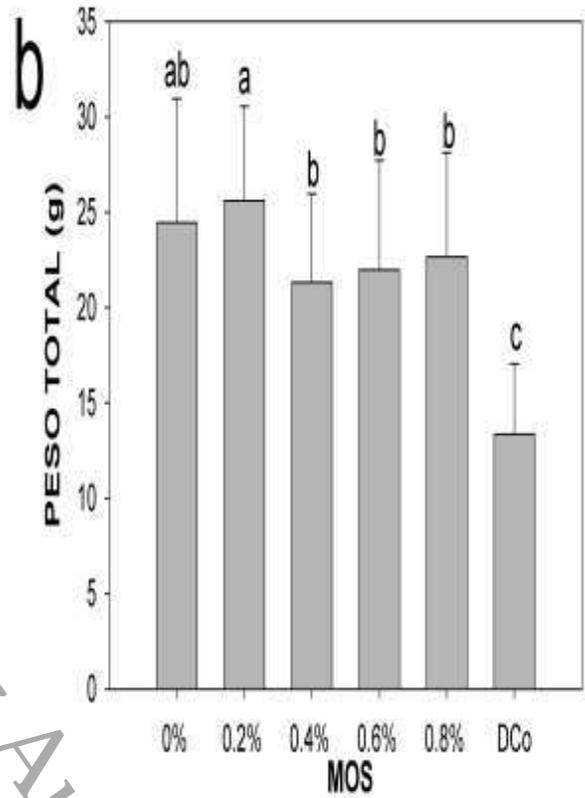
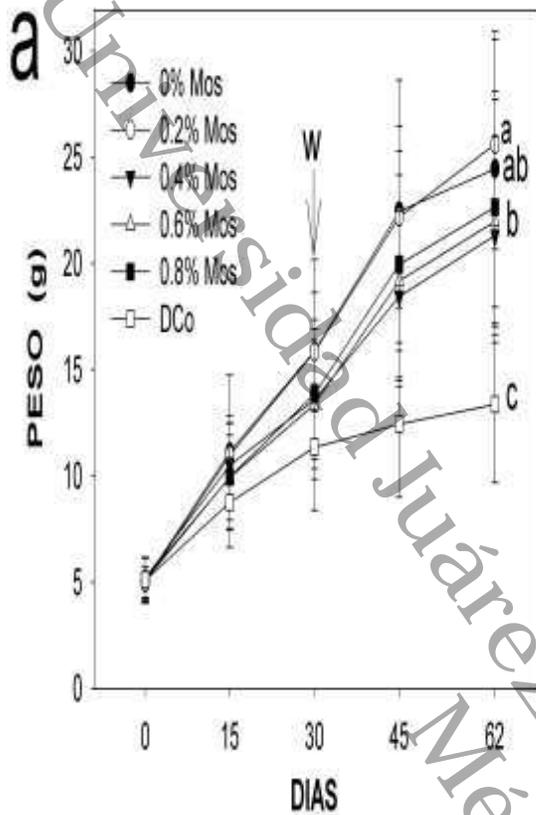




Tabla 1. Formulación de dietas experimentales utilizadas para el cultivo de juveniles de *A. tropicus*.

Ingredientes	MOS				
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Harina de sardina ^a	54.61	54.61	54.61	54.61	54.61
Aceite de sardina ^b	5.40	5.40	5.40	5.40	5.40
Hidrolizado de pescado ^c	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Lecitina de soya ^d	2.70	2.70	2.70	2.70	2.70
Almidón de maíz ^e	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
Grenetina ^f	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla de vitaminas ^g	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premezcla de minerales ^g	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamina C ^h	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Mos (Alltech) ⁱ	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Harina de sorgo 8-10%	26.01	25.9	25.7	25.5	25.3
Composición química (g kg⁻¹)					
Energía (cal/g)	4096.9 ± 0.03	4162.9 ± 0.37	4226.9 ± 0	4239.9 ± 17.0	4339.9 ± 17.0
Proteína	51.8 ± 0.3	51.6 ± 0.3	52.6 ± 0.3	52.4 ± 0.3	52.6 ± 0.3
Lípidos	12.9 ± 0.1	13.4 ± 0.1	14.1 ± 0.1	13.2 ± 0.1	13.7 ± 0.1
Fibra	16.1 ± 0.2	15.6 ± 0.3	14.9 ± 0.2	15.1 ± 0.1	16.3 ± 0.2
Ceniza	14.8 ± 0.1	13.9 ± 0.1	14.1 ± 0.1	14.6 ± 0.1	13.6 ± 0.1

^aProteínas marinas y agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, ^bSigma-Aldrich # catalogo F-8020; ^cFERPAC; ^dPronat Ultra, Mérida, Yucatán, México; ^eMaizena®; ^fD'gari, Productos alimenticios y dietéticos relámpago, S.A. de C.V., Tlalpan, México D. F.; ^gPedregal (para trucha Silver Cup), Toluca, Edo. Mex.; ^hROVIMIX® C-EC (Roche) agente activo de 35%. y ⁱAlltech Inc., Nicholasville, K. Y., USA.





Tabla 2. Índices de crecimiento en juveniles de *Atractosteus tropicus* alimentados con dietas de Manano oligosacáridos (MOS).

Índices	MOS					DCo
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	
TCA	30.54 ± 1.02 a	30.23 ± 3.06 a	26.71 ± 0.34 a	26.89 ± 0.17 a	26.95 ± 0.16 a	21.2 ± 0.06 b
AWG	19.46 ± 1.35 a	20.47 ± 2.56 a	16.40 ± 0.34 a	17.04 ± 0.17 a	17.11 ± 0.16 a	7.95 ± 0.06 b
FCR	1.57 ± 0.06 b	1.48 ± 0.05 b	1.62 ± 0.34 b	1.59 ± 0.17 b	1.57 ± 0.17 b	2.67 ± 0.06 a
PC	16.37 ± 0.55 a	16.20 ± 1.64 a	14.32 ± 0.34 a	14.41 ± 0.17 a	14.44 ± 0.17 a	11.36 ± 0.06 b
PER	1.19 ± 0.04 a	1.26 ± 0.04 a	1.14 ± 0.34 a	1.17 ± 0.17 a	1.18 ± 0.17 a	0.7 ± 0.06 b
SGR (%/dia ⁻¹)	2.63 ± 0.10 ab	2.71 ± 0.12 a	2.37 ± 0.34 b	2.41 ± 0.17 ab	2.45 ± 0.18 ab	1.56 ± 0.06 c
DWG	0.32 ± 0.02 a	0.34 ± 0.04 a	0.27 ± 0.34 a	0.28 ± 0.17 a	0.28 ± 0.18 a	0.13 ± 0.06 b

Letras diferentes significan diferencias significativas (P<0.05).





Tabla 3. Actividad enzimática de juveniles de *Atractosteus tropicus* alimentados con dietas de Manano oligosacáridos (MOS).

Actividad (U mg proteína ⁻¹)	MOS					DCo
	0%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	
Proteasa ácida	420.71 ± 2.23 ab	404.90 ± 5.70 b	412.56 ± 12.03 ab	426.57 ± 2.99 a	321.83 ± 17.04 d	375.31 ± 10.69 c
Proteasa alcalina	145.66 ± 1.82 a	137.57 ± 1.61 b	140.38 ± 5.48 ab	103.86 ± 3.69 c	92.05 ± 5.84 d	89.60 ± 2.26 d
Tripsina	4.42 x 10 ⁻⁵ ± 1.37 x 10 ⁻⁷ b	4.46 x 10 ⁻⁵ ± 4.77 x 10 ⁻⁷ a	3.50 x 10 ⁻⁵ ± 1.37 x 10 ⁻⁷ c	2.25 x 10 ⁻⁵ ± 4.96 x 10 ⁻⁷ d	2.10 x 10 ⁻⁵ ± 2.38 x 10 ⁻⁷ e	1.47 x 10 ⁻⁵ ± 4.96 x 10 ⁻⁷ f
Quimotripsina	0.017 ± 2.51 x 10 ⁻⁴ a	0.012 ± 5.77 x 10 ⁻⁵ b	0.012 ± 2.00 x 10 ⁻⁴ b	0.010 ± 3.78 x 10 ⁻⁴ c	0.010 ± 2.30 x 10 ⁻⁴ d	0.010 ± 3.60 x 10 ⁻⁴ cd
Leucina aminopeptidasa	3.33 x 10 ⁻⁶ ± 2.32 x 10 ⁻⁷ f	1.18 x 10 ⁻⁵ ± 2.52 x 10 ⁻⁷ a	4.59 x 10 ⁻⁶ ± 2.52 x 10 ⁻⁷ e	7.22 x 10 ⁻⁶ ± 1.72 x 10 ⁻⁷ d	8.22 x 10 ⁻⁶ ± 1.89 x 10 ⁻⁷ c	1.03 x 10 ⁻⁵ ± 1.26 x 10 ⁻⁷ b
Lipasa	1.30 x 10 ⁶ ± 40035.0 ab	1.39 X 10 ⁶ ± 17880.6 a	690370 ± 11789.6 d	1.19 X 10 ⁶ ± 67698.5 b	1.26 X 10 ⁶ ± 56848.4 ab	936667 ± 87158.4 c
Amilasa	341.64 ± 2.20 b	390.23 ± 5.76 a	208.78 ± 6.75 c	202.48 ± 13.93 c	195.86 ± 6.60 c	119.25 ± 2.76 d
Carboxipeptidasa	11.10 ± 0.06 b	16.02 ± 0.13 a	7.84 ± 0.06 c	6.04 ± 0.27 e	6.63 ± 0.14d	3.31 ± 0.13 f
Fosfatasa ácida	0.135 ± 0.003 a	0.126 ± 0.006 a	0.100 ± 0.01 b	0.133 ± 0.005 a	0.092 ± 0.006 b	0.045 ± 0.001 c
Fosfatasa alcalina	0.039 ± 0.003 a	0.040 ± 0.002 a	0.038 ± 0.002 a	0.027 ± 0.001 b	0.035 ± 0.004 a	0.016 ± 0.0009 c

Letras diferentes significan diferencias significativas (P<0.05).

