

## Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*)

Juan J. Pérez<sup>1</sup>, Gustavo A. Wicki<sup>2</sup>, Francisco J. Moyano<sup>1</sup>, Francisco J. Alarcón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior, Univ. de Almería (España)

<sup>2</sup> CENADAC, Corrientes (Argentina)

### Resumen

Se evaluó el efecto inhibitorio de tres ingredientes vegetales diferentes (texturizado de soja, desengrasado, afrechillo de arroz y salvado de trigo) sobre la actividad de las proteasas alcalinas de pacú y pejerrey. Se valoró el grado de inhibición en extractos digestivos crudos usando diferentes concentraciones relativas de harinas vegetales y se representó construyendo curvas de inhibición. Se usó un zimograma SDS-PAGE para revelar más detalles en la caracterización de la sensibilidad de algunas enzimas de peces a los inhibidores de las proteasas. Se realizó un ensayo de digestibilidad *in vitro* usando la técnica del pH-stat para pacú con dos piensos que contenían diferentes proporciones de harinas vegetales. Se compararon las actividades ácida y alcalina en pacú para dos grupos alimentados con los dos piensos diferentes. Sorprendentemente se demostró una mayor sensibilidad ante los inhibidores presentes en salvado de trigo y soja para pacú (de hábitos herbívoros y omnívoros) respecto a pejerrey (carnívoro).

### Summary

**Assesment of protease inhibitors present in vegetable feedstuffs used in feeds for two fish species in Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) and Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*)**

The inhibitory effect of three different vegetable foodstuffs (defatted soybean meal, rice bran and wheat bran) on alkaline protease activity of pacu and pejerrey was evaluated. Inhibition degree on crude digestive extracts was assessed using different relative concentrations of plant meals and represented by constructing inhibition curves. SDS-PAGE zymogram was used to reveal further details in the characterisation of sensitivity of some fish enzymes to protease inhibitors. An assay on *in vitro* digestibility with two diets for pacu containing different amount of vegetable meals was realized using pH-stat method. Acid and alkaline activity was compared on pacu for two groups fed on two different diets. Surprisingly, higher sensitivity to inhibitors present in wheat bran and soy bean meals was showed for pacu (herbivorous and omnivorous habits) respect to pejerrey (carnivorous).

## Introducción

El incremento de la acuicultura que prevé la FAO para los próximos años, revertirá en un aumento de la producción de alimentos para las especies acuicultivadas. La producción de alimentos para la acuicultura es en la actualidad una de las industrias agrícolas más florecientes del mundo, con unos crecimientos anuales del 30%. Al menos un tercio de las 122 millones de toneladas del pescado capturado en el año 1997 fue convertido en harina de pescado o aceite de pescado para fabricar piensos animales, incluyendo la acuicultura. La FAO (1) estima que sobre el 40% del total de alimentos de origen marino para acuicultura, fue para especies de peces carnívoros, el 35% para los no carnívoros y 25% para crustáceos. Así, el grueso de la producción de harinas de pescado se usa para salmón, trucha y peces marinos en países occidentales, la acuicultura de agua dulce, principalmente la carpa, también consume una proporción sustancial. Dado el rápido incremento actual del cultivo dulceacuícola en Asia, particularmente en China, existirá en el futuro una fuerte competición por las limitadas fuentes de harinas de pescado a nivel mundial (2 y 3).

La producción de harinas de pescado está localizada en determinadas regiones del planeta, por lo tanto se hace cada vez más caro y difícil para muchos países obtenerlas. La necesidad de encontrar fuentes alternativas de proteínas para reemplazar las harinas de

pescado es obvia y viene recomendada por el Segundo Simposium Internacional de Acuicultura Sostenible (1998) celebrado en Oslo (Noruega).

Es por todo esto que se vienen a justificar los ensayos con fuentes proteicas de origen vegetal (subproductos de la agricultura, excedentes de cereales) para usos en acuicultura, sobre todo en aquellos países en los que se desarrolla de modo incipiente y semiextensivo, como búsqueda de aporte proteico para las poblaciones y para el desarrollo sostenible de zonas rurales o países en vías de desarrollo.

Se conoce que la mayoría de las potenciales fuentes de nutrientes alternativas de origen vegetal para uso en acuicultura, contienen una amplia variedad de sustancias antinutritivas (4). Los factores antinutritivos se han definido como sustancias que, bien por si mismas o a través de productos metabólicos, interfieren con la utilización del alimento y afectan la salud y producción animal (5).

Los inhibidores de las proteasas son factores antinutritivos presentes en muchos ingredientes proteicos de origen vegetal que se pueden usar en la alimentación de peces, particularmente leguminosas (6). Su efecto depende de su origen y el tipo de enzima diana. En la soja, por ejemplo, hay dos grupos de inhibidores de la proteasa: El inhibidor de la proteasa Kunitz, que es relativamente sensible al calor y el ácido, y el más estable inhibidor de la proteasa Bowman-Birk. Una molécula del primero bloquea, bien una molécula de tripsina o de quimotripsina, mientras que el segundo inhibidor bloquea dos moléculas de tripsina o quimotripsina al mismo tiempo (6). La mayoría de los productos de la soja muestran inhibidores de la tripsina en el rango de 2-6 mg/ml (7). Los factores antitripsicos tienen una amplia distribución en el reino vegetal y están presentes en la mayoría de semillas de leguminosas y cereales.

Las especies acucultivadas más comunes difieren en su capacidad de tolerar factores antitripsicos. Se han realizado estudios sobre el efecto de estos inhibidores de las proteasas en las principales especies de peces acucultivadas, como son tilapia (8, 9, 10 y 11), carpa (12 y 13), trucha arco iris (14, 15 y 16), pez gato (17), salmón (18y 19) así como dorada y platija (20).

Es por esto, que se hace necesario al acometer el cultivo de una nueva especie acuícola, el determinar la tolerancia de ésta, a la inclusión en la dieta de harinas de origen vegetal, que pueden contener factores antinutritivos.

El objetivo de este trabajo es determinar el grado de inhibición que sobre las proteasas alcalinas producen los factores antinutritivos que contienen tres tipos de harinas vegetales, el salvado de trigo, la soja y el afrechillo de arroz, así como evaluar el grado de digestibilidad de piensos elaborados con distintos porcentajes de los componentes vegetales antes mencionados.

Este ensayo se realiza con muestras de dos especies de reciente puesta a punto en la acuicultura Argentina, el pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y el pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*). De este modo se pretende realizar una aproximación preliminar en la nutrición de estas especies a la hora de acometer su cultivo, intentando utilizar harinas vegetales accesibles que abaratan costes y promueven una acuicultura sostenible.

## **Material y métodos**

---

### **Muestras animales**

Los ensayos se llevaron a cabo con digestivos completos liofilizados de pacú (de aproximadamente 600 g), provenientes de la estación experimental del Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC) en la región del Noroeste argentino ubicado en el

departamento de Santa Ana, provincia de Corrientes, Argentina. Los alevines de 0.25 g fueron proporcionados por la empresa Isla-Pe (Argentina), siendo alimentados con dos dietas diferentes. La fase de cultivo fue de 495 días.

Para los ensayos con pejerrey se utilizaron digestivos liofilizados provenientes de ejemplares adultos obtenidos en una laguna bonaerense.

### **Preparación de extractos ácidos y alcalinos**

Para la preparación de los extractos ácidos y alcalinos de pacú y pejerrey se procedió a la separación de estómagos e intestinos de los tractos digestivos completos. Se prepararon extractos enzimáticos ácidos y alcalinos de cada individuo para pacú, realizando posteriormente un pool enzimático alcalino con unos ocho ejemplares, para pejerrey se preparó directamente un pool de extracto enzimático alcalino. Los tejidos se homogeneizaron en agua destilada (100 mg/ml para estómago y 200 mg/ml para intestino) y baño de hielo en un homogenizador Heidolph DIAX 900 durante 10 minutos. Posteriormente los extractos obtenidos se centrifugaron durante 10 minutos a 16 000 g y 4°C, recogiendo el sobrenadante y conservándolo a -20°C. La determinación de la proteína soluble en los distintos extractos preparados se evaluó según el método de Bradford (21).

### **Ensayos de actividad proteasa ácida y alcalina totales**

Para medir la actividad ácida total de los extractos de estómago de pacú se utilizó el método de Anson y Walter (22), usando como sustrato hemoglobina. En esencia, 20 µl de extracto enzimático se añadieron a 1 ml de hemoglobina al 1% a pH 2.0. La reacción se mantuvo durante 15 minutos en un baño a 37°C, deteniéndose posteriormente con 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% después se mantuvo la mezcla de reacción durante 5 min aproximadamente en refrigeración a 4°C, para posteriormente ser centrifugado a 16 000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se midió a 280 nm en un espectrofotómetro UV/visible. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de tirosina liberado en 1 min, usando el coeficiente de extinción molar de la tirosina (0.005 ml/µg cm). todas las medidas se hicieron por triplicado.

La actividad proteasa alcalina se evaluó según el método de Kunitz (23), modificado por Walter (22). Para ello se adicionaron 20 µl de extracto alcalino a 0.5 ml de caseína Hammerstein al 1% (p/v) en tampón Tris-HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 9.0. El resto del ensayo se llevó a cabo de manera idéntica al de actividad ácida.

### **Efecto de los inhibidores de proteasa contenidos en las materias primas sobre las proteasas alcalinas**

En este estudio se emplearon tres harinas vegetales diferentes; la harina de soja y el afrechillo de arroz proceden del mercado local de la zona de corrientes (Argentina) y el salvado de trigo se obtuvo en el mercado local de Almería (España). Se obtuvieron extractos de los tres tipos de harina (100 mg/ml en agua destilada) por homogenización durante 10 min. El extracto obtenido se centrifugó a 16 000 g durante 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante y conservándose en alícuotas a -20°C.

El efecto inhibitorio de las soluciones de las tres harinas vegetales se llevó a cabo midiendo la reducción en la actividad proteasa alcalina, siguiendo el método descrito por García-Carreño (24). En primer lugar se incubaron 20 µl de extracto enzimático alcalino durante 30 minutos y a 25 °C, con cantidades crecientes de extracto de harina vegetal (100, 200, 300 y 400 µl) completando hasta los 500 µl con tampón tris-HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM a

pH 9.0. El resto del ensayo se llevó a cabo de forma idéntica a como se describe anteriormente para la determinación de actividad enzimática alcalina total. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Determinación del grado de hidrólisis por pH-stat

Se determinó el grado de hidrólisis de dos piensos A y B, uno comercial y otro experimental, simulando el proceso digestivo en pacú. Los dos piensos fueron proporcionados por G. Wicki y se formularon cumpliendo los requerimientos nutricionales para la especie, así como pretendiendo que fuesen isocalóricos e isoproteicos para su correcta comparación. Las características de los dos piensos son las siguientes (Tabla I).

**Tabla I**  
Composición porcentual de los piensos A y B utilizados en los ensayos.

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Alimento comercial A</b>	<b>Alimento experimental B</b>
Harina pescado	32	20
Harina carne	8	11
Harina soja	20	27
Harina trigo	18	-
Harina maíz	16	10
Afrechillo arroz	-	30
Aceite soja	3	-
Vit. y minerales	3	2

Para determinar el grado de hidrólisis enzimática ácida y alcalina de los dos piensos estudiados se utilizó la técnica del pH-stat desarrollada por Pedersen y Eggum (25), y catalogada como el método más efectivo para determinar la digestibilidad de materias primas por la FAO. Se trata de medir la digestibilidad de la materias primas en base a la "caída" de pH producida por la hidrólisis de los enlaces peptídicos, que se calcula a su vez midiendo el consumo de álcali necesario para mantener el pH constante. El grado de hidrólisis (GH) se determinó utilizando un pH-stat (718 Stat Tritino; Methrom Ltd). Para ello, 10 ml de una solución de proteína (8 mg/ml) se mantenía en agitación continua a 37°C. El proceso de hidrólisis consta de dos fases, la primera simula la digestión ácida (pH 2.0) y se añade el extracto enzimático ácido (800 unidades de actividad, UA), la reacción se mantiene durante 15 minutos en agitación continua. Posteriormente se ajusta el pH a 8.0 con álcali y se añade el extracto alcalino (200 UA); la reacción se continúa durante otros 45 minutos. El grado de hidrólisis se determinó según Alarcón (26).

En las dos piensos se determinó el grado de autohidrólisis o línea base, siendo éste el valor de la hidrólisis (GH%) de la muestra en ausencia del extracto enzimático. Se determinó como se ha indicado anteriormente pero sin adicionar extracto enzimático, ya que éste fue sustituido por un volumen equivalente de agua destilada (26).

### Electroforesis SDS-PAGE de los extractos enzimáticos

Se realizó un zimograma de los extractos alcalinos con y sin inhibidores vegetales en gel de poliacrilamida 10%, según Laemmli (27). Las muestras se prepararon incubando extractos enzimáticos alcalinos con extractos de harina de salvado de trigo y de soja en proporción 1/1, durante 2 horas a 25°C. Se utilizaron 10 µl de todos los extractos para la electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 2 horas a una temperatura de 4°C. La preparación del zimograma se hizo de acuerdo con

García-Carreño (28). Después de la electroforesis, el gel se lavó y se incubó en 0.5% de caseína Hammerstein pH 9.0, durante 45 minutos a 5°C y luego se transfirió a otra solución de caseína idéntica a la anterior y se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Después el gel fue lavado y teñido durante 24 horas con Azul brillante de Coomassie 0.1% (BBC R-250) en una solución de ácido acético:metanol (50:20:50). Por último el gel se destiñó en una solución de ácido acético:metanol:agua (35:10:55).

### Tratamiento estadístico

Para comprobar la significancia entre resultados se realizaron pruebas t para medias de dos muestras emparejadas.

## Resultados

### Experimento 1

- **Ensayos de inhibición**

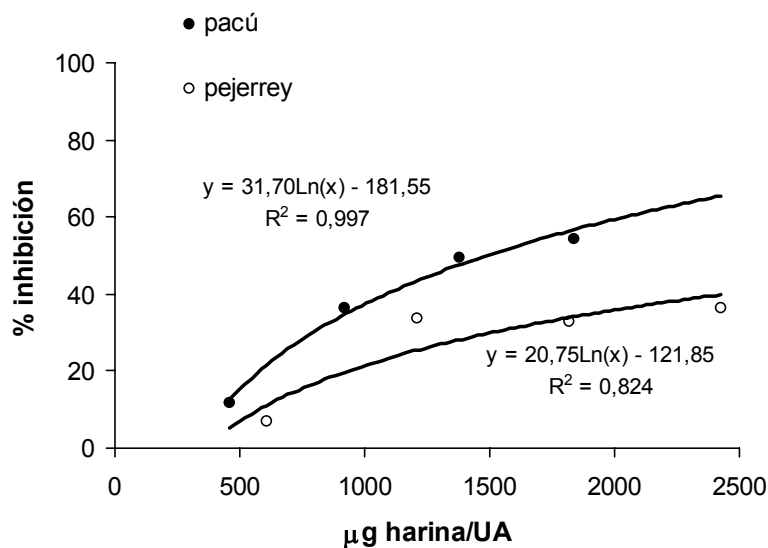
Con este ensayo se pretendía determinar y graficar el porcentaje de inhibición producido al enfrentar cantidades crecientes de extractos de harinas vegetales con una cantidad fija de unidades de actividad enzimática alcalina.

En primer lugar se determinó la actividad en UA/ml de los extractos enzimáticos alcalinos de pacú y pejerrey. Se usó un pool de intestinos de ocho ejemplares de pacú y un pool de unos 2 g de intestinos liofilizados de pejerrey, ambos a razón de 200 mg/ml. Previa medida de actividad se diluyó cuatro veces el extracto de pejerrey para que los datos entraran en rango, y este extracto diluido es el utilizado en todos los ensayos de actividad.

El extracto de soja poseía una mayor cantidad de proteína soluble total, respecto al salvado de trigo, en segundo lugar y por último el afrechillo de arroz.

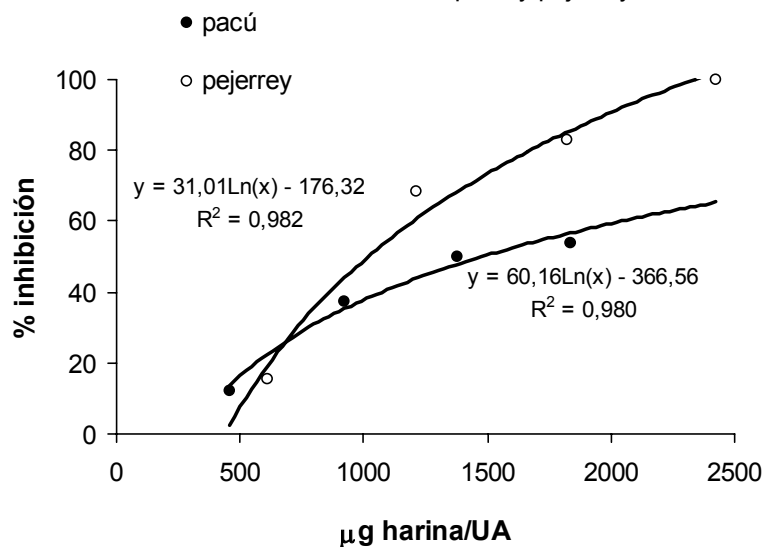
**Figura 1**

Inhibición en % de enzimas alcalinas de pacú y pejerrey frente a salvado de trigo.



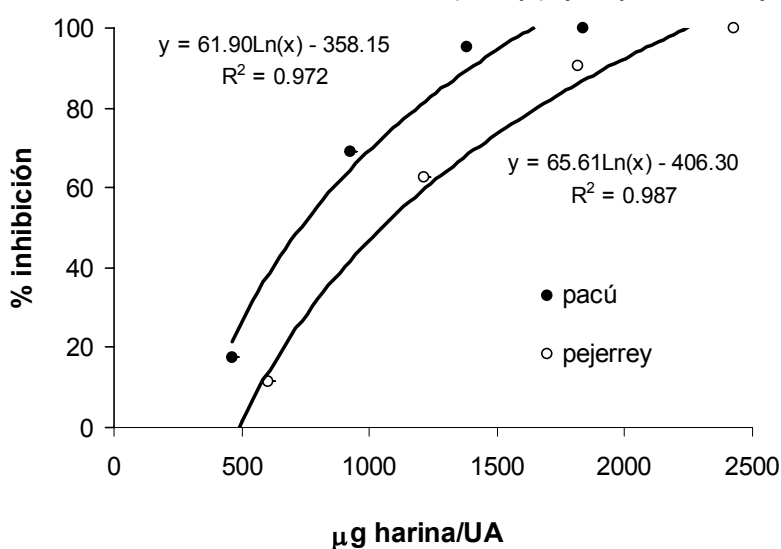
**Figura 2**

Inhibición en % de enzimas alcalinas de pacú y pejerrey frente a afrechillo de arroz.



**Figura 3**

Inhibición en % de enzimas alcalinas de pacú y pejerrey frente a soja.



Se enfrentaron concentraciones de 100, 200, 300 y 400 μl de extractos de harinas vegetales con 20 μl de extracto enzimático alcalino, por lo tanto en la mezcla de reacción tendríamos cantidades iguales de extractos vegetales para ambos peces, frente a diferentes unidades de actividad enzimáticas para pacú y pejerrey (21.76 UA para pacú y 16.5 UA para pejerrey respectivamente en 20 μl de extracto enzimático).

Se representó el porcentaje de inhibición frente a los μg de harina vegetal/U actividad enzimática.

En el caso del salvado de trigo, la inhibición de las proteasas es gradual, sólo afectando a la actividad enzimática de forma severa con concentraciones altas de extracto vegetal. Los factores inhibidores afectan en mayor medida y de forma sensible a las proteasas de pacú, aunque en ninguno de los dos casos la inhibición se acerca al 100%.

Para el afrechillo de arroz, el perfil de inhibición es muy similar para pacú al caso anterior, sin embargo, para pejerrey el porcentaje de inhibición aumenta de forma brusca y a altas concentraciones de extracto de arroz por unidad de actividad enzimática, ésta llega a ser casi total.

Los datos arrojados para el ensayo con soja delatan la alta presencia de factores antinutritivos en esta semilla. Para pacú las proteasas alcalinas se ven inhibidas en gran medida a concentraciones moderadas de extracto de soja, llegando la inhibición a ser total para concentraciones elevadas. Las enzimas de pejerrey demuestran menor grado de inhibición a los inhibidores de la soja, aunque también se alcanza casi el total del porcentaje de inhibición.

## Experimento 2

- **Ensayo de actividad enzimática ácida y alcalina en pacú cultivado bajo dos tipos de dieta**

Se determinaron las actividades enzimáticas ácidas y alcalinas de diez ejemplares de pacú, cinco de los cuales habían sido alimentados durante un periodo de 495 días con una dieta comercial A y otros cinco con una dieta experimental B; todo esto con el objeto de determinar la existencia de diferencias significativas en la actividad enzimática estomacal e intestinal ante la ingesta continuada de ingredientes de origen vegetal con contenido en inhibidores de las proteasas. La composición porcentual de los dos piensos viene detallada en la tabla I, en la que se da el porcentaje de cada harina utilizada en el ensayo de inhibición. Para el pienso A los datos son de un 20% de harina de soja y un 18% de harina de salvado de trigo, y para el pienso B, un 27% de soja y un 30% de afrechillo de arroz.

**Tabla II**

Actividad en U/ml y actividad específica de los extractos enzimáticos.

	Extracto alcalino de pacú	Extracto alcalino de pejerrey
Actividad U/ml	1 088 ± 55	888 ± 24
Actividad específica UA/mg proteína soluble total	1 292 ± 65	767 ± 21

A través de estos datos para los diferentes individuos representados por el tipo de pienso A (comercial) y B (experimental) se puede observar la disparidad individual en cuanto a niveles de actividad (UA/ml de extracto enzimático).

Una vez obtenidos los datos de actividad en UA/ml de extracto, se hallaron los resultados de proteína soluble total por el método Bradford (21) para determinar la actividad enzimática específica en UA/mg. prot. soluble total.

Al obtener los datos de actividad específica se sigue observando variabilidad entre individuos. Este hecho podría venir dado por el estado nutricional y fisiológico de cada ejemplar, por tanto se hace necesario el tratamiento estadístico para determinar diferencias significativas entre los datos promedio de los dos grupos de peces alimentados con dietas de distinta composición.

Una vez hallado el promedio se sometió los datos a una prueba estadística t para medias de dos muestras emparejadas, dando como resultado el no existir diferencias significativas de actividad enzimática y de ratio entre actividad estomacal e intestinal.

**Tabla III**

Datos promedio de actividad enzimática específica en UA/mg prot. y ratio entre actividad ácida y alcalina.

	Actividad	Dieta A	Dieta B
Promedio	ácida	3 935 ± 1 092	3 454 ± 3 985
	alcalina	1 055 ± 297	922 ± 157
Ratio		3.731	3.746

- **Zimograma alcalino de pacú y pejerrey**

Con el zimograma de proteasas alcalinas de pacú y pejerrey se pretendía observar el perfil enzimático de ambas especies. Se puede observar una mayor diferenciación en las proteasas alcalinas para pacú debido a la aparición de bandas de actividad que determinan cadenas ligeras y pesadas, mientras que en pejerrey las bandas encontradas se concentran en la parte superior del zimograma (cadenas pesadas) siendo sus proteasas más similares. Esto respalda el hecho de que los hábitos alimentarios del pacú sean omnívoros, enfrentándose su equipo enzimático a diversidad de alimentos, mientras que el pejerrey es un pez carnívoro con una dieta menos diversa.

**Figura 4**

Zimograma alcalino de pacú y pejerrey.



A -pacú (5 µl)  
B - pejerrey (5 µl)  
C - pacú + soja (5 µl + 5 µl)  
D -pejerrey + soja (5 µl + 5 µl)

En cuanto a la preincubación de las enzimas alcalinas con harina de soja se puede observar que la actividad en pacú (C) se ve afectada de una manera importante, quedando una única banda principal de actividad. En pejerrey (D) las dos cadenas pesadas principales se ven afectadas probablemente al corresponder a enzimas más homólogas.

### Experimento 3

- **Ensayo de hidrólisis enzimática para los dos piensos (comercial A, y experimental B) ensayados con pacú**

Los datos arrojados por los ensayos de hidrólisis enzimática *in vitro*, muestran el grado de hidrólisis de la fracción proteica de ambas dietas ante la acción enzimática ácida y alcalina de pacú. Primeramente se determinó la proteína bruta de ambos piensos para



realizar los ensayos incluyendo 80 mg/ml de proteína bruta total en un volumen final de 10 ml. Existe la necesidad de determinar el grado de autohidrólisis de los dos piensos para crear una línea base, porque aunque a efectos prácticos el grado de hidrólisis nos da idea de la digestibilidad del pienso, la ruptura enzimática de la proteína puede diferir de un caso a otro.

**Tabla IV**

Proteína bruta expresada en porcentaje (método Kjendahl) y porcentaje de humedad de ambos piensos.

	% proteína	% humedad
Pienso A (comercial)	35.8	11.8
Pienso B (experimental)	37.8	9.2

**Tabla V**

Grado de autohidrólisis e hidrólisis total en porcentaje, diferencia entre hidrólisis total y autohidrólisis.

	Autohidrólisis %	GH %	diferencia
Pienso A	1.98 ± 0.16	6.2 ± 0.09	4.22
Pienso B	0.77 ± 0.19	5.35 ± 0.04	4.57

Los datos reflejan una mayor digestibilidad de la fracción proteica del pienso A (comercial) frente a la del pienso B (experimental). Este hecho se puede explicar por un mayor grado de autohidrólisis de la dieta comercial respecto a la experimental, que puede venir dado por una mayor proporción de péptidos sencillos o sometidos a algún proceso de predigestión (como es común en la fabricación industrial de piensos), así como el mayor porcentaje de harina de pescado como fuente proteica de alta calidad. Estos datos contrastan con los resultados *in vivo* obtenidos por G. Wicki (29) en los que el pienso experimental mostró un mejor grado de conversión alimentaria y los pesos medios finales fueron mayores para el grupo alimentado con este pienso. Una posible explicación frente a estos resultados vendría dada por el hecho de que la especie manifiesta características herbívoras (30) y por tanto aprovecharía con alta eficiencia los hidratos de carbono como fuente de energía (igual que ocurre con la carpa común (*Cyprinus carpio*) de hábitos alimentarios omnívoros). Al respecto, Chow y cols. (31), informan de una digestibilidad del 48% de almidón en la dieta para carpa común, mientras Degani y cols. (32) reportan una digestibilidad entre el 81 y 93% para carbohidratos en tilapias adultas.

La dieta experimental podría considerarse como de una calidad de proteína inferior, debido a la menor proporción de aminoácidos esenciales (como consecuencia de la disminución en la harina de pescado), esta última sería suficiente para cumplir los requerimientos de la especie. La mayor proporción de hidratos de carbono incluidos en la dieta experimental podría haber influido en el mejor rendimiento reflejado; coincidiendo con lo expuesto por Bowen (33) cuando sugiere que la diferencia absoluta en los requerimientos nutricionales de los peces estaría en referencia a su requerimiento en energía y no en proteína.

En cuanto a la preincubación de las enzimas alcalinas con harina de soja se puede observar que la actividad en pacú (C) se ve afectada de una manera importante, quedando una única banda principal de actividad. En pejerrey (D) las dos cadenas pesadas principales se ven afectadas probablemente al corresponder a enzimas más homólogas.

## Discusión

---

La reducción en el valor nutritivo de proteínas vegetales en piensos para peces, debido a la presencia de factores antinutritivos, es un hecho bien documentado (22, 34 y 35). De estos factores los más relevantes son los inhibidores de proteasas, de origen proteico, que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de los equipos enzimáticos del tracto intestinal de peces. El efecto negativo del uso de dietas que contienen inhibidores en el crecimiento de los peces podría deberse a diversos factores como son el tipo de harinas utilizadas, el nivel de cada harina en la dieta, la extensión del periodo de alimentación y la sensibilidad de una especie dada a los factores antinutritivos presentes en los compuestos vegetales.

Es evidente que ni todos los inhibidores de las proteasas existentes en vegetales son iguales, ni están presentes en la misma cantidad. Estos compuestos han sido identificados en una gran diversidad de especies vegetales, siendo particularmente abundantes en semillas de leguminosas (como se ha demostrado en el presente ensayo con la soja, que contiene un alto nivel proteico y por tanto gran cantidad de sustancias inhibidoras de carácter proteico), y también en cereales y subproductos.

Es evidente la presencia de inhibidores de las proteasas alcalinas en las tres harinas ensayadas, salvado de trigo, afrechillo de arroz y soja. Estos inhibidores se mantienen en los piensos a pesar de los tratamientos específicos para eliminarlos. En trabajos anteriores (20) se ha determinado como general o inespecífica la inhibición producida por el salvado de trigo, mientras que la inhibición causada por la harina de soja se considera específica, afectando de modo diferente a las distintas proteasas alcalinas.

La importancia del nivel de inclusión en la dieta de las distintas harinas vegetales se pone de manifiesto en las curvas de inhibición de materias primas elaboradas para las dos especies de peces. Estos ensayos constituyen una manera fácil de determinar el efecto de distintas cantidades de harinas vegetales en la dieta. En este caso todos los perfiles de inhibición se corresponden con tendencias sigmoidales, aunque no siempre ocurre de este modo. Se puede observar que no para todas las harinas vegetales se permite el mismo porcentaje de inclusión en la dieta. Así, mientras que para el salvado de trigo el porcentaje de inhibición varía de forma gradual en ambas especies, sin llegar a producir una inhibición total, así como ocurre con el afrechillo de arroz (aunque la inhibición llega a ser casi total para pejerrey), con la soja el grado de inhibición experimenta una variación mucho más brusca en ambos casos. Las ecuaciones obtenidas para las curvas permiten elaborar dietas para especies de incipiente desarrollo en acuicultura en las que se tengan en cuenta los porcentajes adecuados y tolerables para el óptimo crecimiento y cultivo de los peces.

Con el ensayo de determinación de actividades ácidas y alcalinas para dos grupos de pacú alimentados con dos piensos distintos ricos en harinas vegetales se pretendió determinar posibles efectos de la alimentación prolongada con piensos que contengan inhibidores. Las respuestas fisiológicas de las especies de peces a la ingesta de dietas que contengan inhibidores, constituye un tema controvertido. La inhibición de las proteasas es compensada por un aumento en la secreción de enzimas pancreáticas y por una mayor absorción en el intestino distal, tal y como se ha comprobado en la trucha arco iris tras ser alimentada con dietas que contenían pequeñas cantidades de harina de soja (16), y en otros salmónidos. Sin embargo, aunque el proceso digestivo podría concluirse satisfactoriamente bajo tales condiciones, el coste energético para las especies podría ser elevado, como resultado de la síntesis adicional de enzimas. Además se ha constatado que existe una mayor síntesis de proteasas ricas en cisteína.

Bajo tales condiciones, una alimentación prolongada disminuye la eficacia de la alimentación y el crecimiento de las especies. En el ensayo con dos piensos para pacú, uno con más harina de soja (experimental) y otro con menos (comercial) no se detectan diferencias significativas entre las actividades ácida y alcalina de ambos grupos.

Queda claro en los ensayos que los inhibidores presentes en las tres harinas ensayadas son diferentes, y que la sensibilidad a estos inhibidores así como a distintas cantidades de estos, es distinta para ambas especies. Mientras que pacú es más sensible a los inhibidores presentes en salvado de trigo y soja, para el pejerrey la sensibilidad es mayor para el afrechillo de arroz.

En cuanto a la hidrólisis enzimática *in vitro* de ambos piensos, se hace evidente que a pesar de que los ensayos de digestibilidad proteica resultan favorables para el pienso comercial, más rico en proteínas de alta calidad (harina de pescado), se hace necesario realizar estudios más amplios de presencia de amilasas y digestibilidad de carbohidratos para determinar *a priori* los efectos de crecimiento en peces, como han demostrado los ensayos *in vivo*. Una posible explicación a estos resultados viene dada porque tanto los peces herbívoros, así como carnívoros y omnívoros (36), requieren todos la misma cantidad de proteína dietaria por unidad de peso y que los peces herbívoros y omnívoros de agua dulce utilizan proteínas y aceites vegetales mejor que los carnívoros; requiriendo mínimas cantidades de harinas de pescado para abastecerse de aminoácidos esenciales.

## Conclusiones

---

En suma se puede decir que pacú presentó una importante sensibilidad a los inhibidores de las proteasas presentes en las harinas vegetales ensayadas en este trabajo. Esto es en cierto modo algo sorprendente debido a los hábitos alimenticios de herbívoro de esta especie, aunque concuerda con datos arrojados para otras especies de hábitos similares como el caso de la tilapia.

Cabe destacar la posibilidad de incluir porcentajes de harinas vegetales en piensos para pejerrey como una posible especie con futuro en la Acuicultura argentina, a pesar de ser una especie de hábitos carnívoros.

Además del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se puede determinar la presencia de factores antinutritivos mediante ensayos accesibles, orientados a la evaluación del efecto de los mismos sobre las enzimas digestivas de peces con futuro en Acuicultura, como etapa previa a la elaboración de dietas.
- Existen numerosos inhibidores de las proteasas alcalinas, estando presentes en gran diversidad de nutrientes de origen vegetal, siendo algunos de ellos resistentes a los tratamientos tecnológicos usuales en la industria de piensos.
- La sensibilidad de las diversas especies a los inhibidores de las proteasas varía de forma evidente, tanto ante el tipo de inhibidores como ante diferentes cantidades de estos.
- La combinación de estas pruebas *in vitro* con otras *in vivo*, debe permitir la elaboración de dietas óptimas en las que se aprovechen los recursos locales y sean convenientes para el crecimiento de la especie en cuestión.

## Referencias

1. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. FAO, Rome. 1999
2. SARGENT JR, TACON AGJ. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* 1999;58:377-383.
3. NAYLOR RL, GOLDBURG RJ, PRIMAVERA JH, KAUTSKY N, BEVERIDGE MCM, CLAY J ET AL. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 2000;405:1017-1024.
4. FRANCIS G, HARINDER PS, MAKKAR, KLAUS BE. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 2001;3-4:197-227.
5. MAKKAR HPS. Antinutritional factors in foods for livestock. En : GILL M, OWEN E, POLLOT GE, LAWRENCE TLJ (Eds). *Animal Production in Developing Countries* Occasional publication No 16. British Society of Animal Production 1993;69-85.
6. NORTON G. Proteinase inhibitors. En: D'MELLO FJP, DUFFUS JH (eds), *Toxic Substances in Crops Plants*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 4WF, Cambridge, 1991;68-106.
7. SYNDER HE, KWON TW. *Soybean Utilization*. Van Nostrand Reinhold, New York. 1987
8. JACKSON AJ, CAPPER BS, MATTY AJ. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture* 1982;27:97-109.
9. SHIAU SY, CHUANG JL, SUN CL. Inclusion of soybean meal in tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*) diets at two protein levels. *Aquaculture* 1987;65:251-261.
10. SHIAU SY, KWOK CC, HWANG JY, CHEN CM, LEE SL. Replacement of fishmeal with soybean meal in male tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*) fingerling diets at suboptimal protein level. *J. World Aquacult. Soc.* 1989;20: 230-235.
11. WEE KL, SHU S-W. The nutritive value of boiled full-fat soybean in pelleted feed for Nile tilapia. *Aquaculture* 1989;81:303-314.
12. Abel HJ, Becker K, Meske CHR, Friedrich W. Possibilities of using heat-treated full-fat soybeans in carp feeding. *Aquaculture* 1984;42:97-108.
13. MAKKAR HPS, BECKER K. Nutritional studies on rats and fish (carp, *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. *Plant Foods Hum. Nutr.* 1999;53:183-192.
14. DABROWSKI K, POCZYCZYNSKI P, KÖCK G, BERGER R. Effect of partially or totally replacing fishmeal protein by soybean meal protein on growth, food utilisation and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for endocrine pancreatic secretion. *Aquaculture* 1989;77:29-49.
15. RUMSEY GL, HUGHES SG, WINFREE RA. Chemical and nutritional evaluation of soy protein preparations as primary nitrogen sources of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 1993;40:135-151.
16. KROGDAHL A, LEA TB, OLLI JJ. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem Physiol.* 1994;107A:215-219.
17. WILSON RP, POE WE. Effects of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities on growth of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 1985;46:19-25.
18. HIGGS DA, MCBRIDE JR, MARKERT JR, DOSANJH BS, PLOTNIKOFF DM, CLARKE CW. Evaluation of Tower and Candle rapeseed (canola) meal and Bronowski rapeseed protein concentrate as protein supplements in practical dry diets for juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 1982;29:1-31.
19. OLLI JJ, KROGDAHL A. Nutritive value of four soybean products in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) reared in fresh water. *Acta Agric. Scand. Sect A: Anim. Sci.* 1994;44:185-192.
20. MOYANO FJ, MARTÍNEZ I, DÍAZ M, ALARCÓN FJ. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochemistry and Physiology Part B* 1999;122:327-332.

21. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 1976;72.
22. WALTER HE. Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: BERGMAYER HJ (ed). *Methods of Enzymatic Analysis, vol V.* Weinheim: Verlag Chemie, 1984;270-7
23. KUNITZ M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 1947;30:291-310.
24. GARCÍA-CARREÑO FL, NAVARRETE DEL TORO A, EZQUERRA JM. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology* 1997;5:36-40.
25. PEDERSEN B, EGGUM BO. Prediction of protein digestibility by an in vivo enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim Physiol. Anim Nutr.* 1983;49:559-565.
26. ALARCÓN FJ, MOYANO FJ, DÍAZ M, FERNÁNDEZ DÍAZ C, YÚFERA M. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using in vitro digestibility techniques. *Aquaculture Nutrition* 1999;5:107-113.
27. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;227:680-5.
28. GARCÍA-CARREÑO FL, DIMES LE, HAARD NF. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 1993;214:65-9.
29. WICKI GA. *Cultivo y producción de pacú (Piaractus mesopotamicus): Incidencia de dos dietas de diferente composición y de la densidad de siembra, en sistema de cultivo semi-intensivo.* Tesis Doctoral. 2003
30. Pereyra de Godoy M. *Peixes do Brasil. Subordem Characoidei.* Volume II. Ed. Franciscana, SP Brasil. 1975;217-397.
31. CHOW KW, RAMSEY GL, WALDRUPP PW. Linear programming for fish diet formulation. En: AMCP (Eds) *Fish Feeding Technology.* FAO, Rep No ADCP/REP/80/11, Roma. 1980
32. DEGANI G, VIOLA S, YEHUDA Y. Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia (*O. aureus* x *O. niloticus*). *The Israeli Journ. of Aquac.* 1997;49, 115-123.
33. BOWEN S. Dietary protein requirement of fishes. A reassessment. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1987;44:1995-2001.
34. KROGDAHL A. Antinutrients affecting digestive functions and performance in poultry. En: LARBIER M (ed). *Proc 7th Eur. Poultry conf* 24-28 Aug. Paris Wids. Poultry Sci. Assoc. Paris: Branche Francaise 1986;239:48.
35. TACON AGJ. Fish meal replacers: review of antinutrients within oilseeds and pulses-a limiting factor for the aquafeed Green Revolution? *. Cah Opt Mediterranean* 1997;22:153-82.
36. ROSAMOND L, GOLDBURG R, PRIMAVERA J, KAUTSKY N, BEVERIDGE M, GLAY J ET AL. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 2000;405, 1017-1023.