

Sustitución de pasta de soya por *Cannavalia ensiformis* en el crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Perciforme: Cichlidae)

Substitution of soy paste by *Cannavalia ensiformis* in the growth, survival, and enzymatic activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Perciforme: Cichlidae)

Fanny Janet de la Cruz-Alvarado¹, Carlos Alfonso Álvarez-González¹, Héctor Nolasco-Soria², Rafael Martínez-García^{1*}, Emyr Peña¹, Susana Camarillo-Coop¹, José Manuel Piña-Gutierrez¹, Bartolo Concha-Frías¹

RESUMEN

La harina de la leguminosa *Cannavalia* posee características nutricionales que la hacen apta para usarse como suplemento alimenticio en peces. Es una fuente de energía, proteína, vitaminas y minerales, pero posee factores antinutricionales que limitan su aprovechamiento. Se determinó el efecto de la inclusión de *Cannavalia* cocida en crecimiento, supervivencia y actividad enzimática digestiva de tilapia. Se formularon dietas para sustituir pasta de soya (PS) por harina de *C. ensiformis* cocida (HCe): T1 (0% HCe-100% PS), T2 (25% HCe-75% PS), T3 (50% HCe-50% PS), T4 (75% HCe-25% PS) y T5 (100% HCe-0% PS). El mejor crecimiento en tilapia se obtuvo con T1 y resultó inversamente proporcional al porcentaje de inclusión. La supervivencia se vio afectada en el T2 (91.1%) y T5 (94.4%). La mayor actividad enzimática se presentó en T5 seguida de T2 en proteasas ácidas y alcalinas; la actividad de tripsina no fue significativa; la actividad de quimotripsina mostró mayor actividad enzimática en T5 y fue significativa en todos los tratamientos.

PALABRAS CLAVE

Cannavalia ensiformis, crecimiento, enzimas digestivas, proteasas, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

Cannavalia ensiformis has nutritional characteristics as feed supplement in fish. Is a good source of energy, protein, vitamins and minerals, but it has antinutritional factors which limit its utilization. The effect of *Cannavalia* inclusion in the growth, survival and enzymatic activity in tilapia were determined. Soy paste was substituted (PS) for boiled *C. ensiformis* meal (HCe): T1 (0% HCe-100% PS), T2 (25% HCe-75% PS), T3 (50% HCe-50% PS), T4 (75% HCe-25% PS), and T5 (100% HCe-0% PS). Results indicated better growth of *O. niloticus* with T1. Survival was affected on T2 (91.1%) and 100% (94.4%). The greatest enzymatic activity was on T5 followed by T2 on acid proteases and alkaline; thetrypsin activity was not significant; the chymotrypsin activity showed greater enzymatic activity on T5, being significant in all treatments. Results indicated that better inclusion level of *C. ensiformis* was on 25%, growth was inversely proportional to inclusion percentage.

KEYWORDS

Cannavalia ensiformis, growth, enzymes activity, proteases, *Oreochromis niloticus*

¹ Laboratorio de Acuicultura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.

² Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur, México.

* Autor de correspondencia. Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5. 86139 Villahermosa, Tabasco, México.
E-mail: biologomartinez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Debido a la alta demanda de pasta de soya, existe la incertidumbre respecto de su disponibilidad a mediano plazo. Es por esto que algunos investigadores han analizado otros productos de origen vegetal como fuentes alternas de proteína en alimentos para peces (Tacon *et al.*, 1984; Kikuchi, 1999; Cruz-Suárez *et al.*, 2001).

Las leguminosas cuentan con contenido elevado de proteína de buena calidad, vitaminas y minerales, particularmente fósforo y hierro (Martínez-Palacios *et al.*, 2000). Dentro de este grupo se encuentra *Canavalia ensiformis* (L.) DC, especie originaria de regiones tropicales (Fagbenro *et al.*, 2007) con potencial nutricional estudiado en varias especies terrestres (Wyss y Biczaj, 1988; Udedibie, 1990; Udedibie y Nkwocha, 1990). Su aplicación en peces ha sido evaluada por varios autores (Akinbiyi, 1992; Martínez-Palacios *et al.*, 1988, Abdo-de la Parra *et al.*, 1998; Osuigwe *et al.*, 2002; Fagbenro *et al.*, 2007; Okomoda *et al.*, 2016; Tiamiyu *et al.*, 2016). Sin embargo, su enorme potencial nutritivo se ve reducido por todo un conjunto de factores antinutricionales (FAN), que obstruyen el aprovechamiento de sus nutrientes y limitan su uso en la elaboración de dietas para peces (Martínez-Palacios *et al.*, 1988; Abdo de la Parra *et al.*, 1998; Osuigwe *et al.*, 2002; Fagbenro *et al.*, 2007; Akande y Fabiyi, 2010). Los FAN que se encuentran en esta especie son: la canavanina (Rosenthal, 1992), concanavalina A y B (lectinas), inhibidores de proteasas, fitatos y ácidos oxálicos que afectan significativamente el crecimiento y procesos fisiológicos, e incluso llegan a provocar la mortalidad en los peces (Alegbeleye *et al.*, 2001).

Considerando lo anterior, Okomoda *et al.* (2016) y Tiamiyu *et al.* (2016) han obtenido buenos resultados de eliminación de FAN utilizando procesos térmicos en semillas de *C. ensiformis*, lo cual incrementa la biodisponibilidad de los nutrientes. Sin embargo, es necesario determinar el efecto de *C. ensiformis* en *Oreochromis niloticus* para estipular su factibilidad de inclusión dietaria. También es importante apoyarse en análisis sobre la actividad enzimática digestiva del pez, que ayuden a mejorar la nutrición animal (Köprücü y Ozdemir, 2005), ya que un alimento que no puede ser digerido es de poco valor nutricional (Köprücü y Ozdemir, 2005). A este respecto, la actividad de la pepsina, tripsina y quimotripsina se utiliza como un indicador de la capacidad digestiva del pez (Moyano *et al.*, 1996).

La presente investigación se diseñó para determinar el efecto en parámetros productivos de los

diferentes niveles de sustitución de la pasta de soya por harina *C. ensiformis* cocida, así como su efecto en la actividad de proteasas digestivas de *O. niloticus*, con la finalidad de evaluar su inclusión como fuente de proteína alterna para el cultivo de la tilapia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas, perteneciente a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Se evaluó el crecimiento, la supervivencia y la actividad de enzimas digestivas en juveniles de *O. niloticus* usando cinco diferentes niveles de sustitución de pasta de soya por harina cocida de *C. ensiformis*.

Obtención de organismos

Para este experimento, los juveniles de tilapia se obtuvieron de un lote de reproductores de 150 hembras (150 g en promedio) y 50 machos (200 g en promedio) mantenidos en un tanque rectangular de concreto de 300 m³, localizado en el área de reproducción de tilapia del Laboratorio de Acuicultura Tropical. Las crías se obtuvieron de la colecta de embriones para la cual se utilizó un cedazo de plástico de 1 mm de luz malla y fueron colocadas en un estanque circular de plástico de 2 000 L, donde, durante 28 días, se les proporcionó un alimento comercial hormonado para tilapia con 52% de proteína y 14% de lípidos (El Pedregal Silver Cup®, Toluca, México) que contenía una dosis de 60 mg/kg de 17 α -metiltestosterona (MT) para promover su reversión sexual. Finalmente, los peces fueron sembrados en un sistema de recirculación para iniciar el experimento.

Diseño experimental

El experimento consistió en la sustitución parcial de pasta de soya (PS) por harina de *C. ensiformis* cocida (HCe), en cinco niveles de inclusión: T1 (0% HCe-100% PS), T2 (25% HCe-75% PS), T3 (50% HCe-50% PS), T4 (75% HCe-25% PS) y T5 (100% HCe-0% PS), respectivamente. Éstos fueron evaluados por triplicado en un sistema de recirculación que constó de 15 unidades experimentales de 100 L de capacidad conectados a una bomba centrífuga de 1/3 HP (Jacuzzi Star-rite®, JWPA5D-230^a Delavan, Winsconsin, USA), un filtro de arena (STA-RITE®, S166T, Delavan, Winsconsin, USA), una lámpara de UV de 25 Watts

(Emperor Aquatics®, 02025, Pottstown, USA), un termostato de titanio (PSA®, R9CE37I, Delavan, USA) y un reservorio de concreto de 2000 L de capacidad. Se colocaron 15 alevines por unidad experimental con peso promedio de 0.972 ± 0.05 g y una longitud promedio de 3.84 ± 0.15 cm, distribuidos aleatoriamente, con un total de 225 alevines de tilapia del Nilo *O. niloticus*. Durante el experimento, los peces fueron alimentados cuatro veces al día (9:00, 11:00, 13:00 y 15:00 h) con una ración equivalente a 10% de su biomasa. La concentración de oxígeno (6.24 ± 0.24 mg/l) y la temperatura (28.72 ± 0.16 °C) se midieron con un oxímetro YSI® 55 (con precisión de 0.1 °C y 0.01mg/l, California, USA) y el pH (7.2 ± 0.23) con un potenciómetro (Hanna Instruments®, HI 98311, Rhode Island, USA). La red de aireación contenía una piedra porosa por unidad experimental, alimentada por un aireador (Sweetwater, 0.5 HP). La limpieza de las unidades se realizó mediante sifón tres veces al día para retirar las excretas. Las biometrías se llevaron a cabo cada 15 días utilizando aceite de clavo a una concentración de 0.1 mL/L de agua como anestésico. Los peces se dejaron en inanición 24 h antes de la biometría.

Procesamiento de la harina y formulación de las dietas

Para el procesamiento de cocción de la harina de *C. ensiformis*, se pesaron 200 g de semillas de *C. ensiformis*; luego, se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se hidrataron con 1 L de agua destilada durante 12 h a temperatura ambiente. Después, se procedió a decantar y lavar con agua destilada. Posteriormente, se llevaron a ebullición durante 30 minutos usando una relación frijol: agua de 1:5 (Anduaga-Cota *et al.*, 2002). El frijol se decantó y se secó en una estufa (VWR®, modelo 1680) a temperatura de 70 °C por 24 h; seguidamente, se molieron las semillas en un pulverizador (PULVEX® 200, México, D. F.) tamizando a 500 micras y se almacenaron a 4 °C. Posteriormente, se formularon las cinco dietas isocalóricas e isolipídicas utilizando la harina de *C. ensiformis* cocida por medio del programa MIXITWIN V. 5.0 como se muestra en el cuadro 1.

Parámetros de crecimiento y supervivencia

El experimento tuvo una duración de 45 días y, al final de éste, se determinaron la ganancia absoluta en peso (AWG, g pez⁻¹) = W_f (g) – W_i (g); la tasa de crecimiento específico (SGR, %) = $100 (\ln W_f - \ln W_i) / T$,

donde: W_i y W_f son el peso inicial y final del pez, respectivamente, y T es el número de días en el periodo de alimentación; el factor de conversión de alimento (FCR) = alimento seco entregado (g) / ganancia en peso húmedo (g); la eficiencia del alimento FE = (peso final – peso inicial) / alimento consumido y la supervivencia (%) = organismos finales / organismos iniciales x 100.

Preparación de extractos multienzimáticos

Al terminar el bioensayo, los peces se mantuvieron en inanición por 24 h para eliminar el exceso de heces y el alimento del tracto digestivo. Al día siguiente se sacrificaron por shock térmico ocho juveniles por unidad experimental y se les extrajo el estómago y el intestino sobre una placa fría a una temperatura de 4 °C para evitar desnaturalización enzimática. La metodología para esta preparación se apega a la propuesta por Saunders *et al.* (1972), que más tarde fue modificada por Dimes y Haard (1994). Las muestras de los intestinos fueron homogenizadas a partir de cada réplica experimental en el buffer Tris-HCl 50 mM + CaCl₂ 25 mM, pH 7.5. Por su parte, los estómagos se homogenizaron con buffer Glicina-HCl al 0.1 M, pH 2.0. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C; se les extrajo el sobrenadante y se almacenaron a –20 °C hasta el momento de su análisis.

Actividad enzimática

Para medir la actividad específica de las proteasas digestivas, se utilizaron las técnicas que se describen a continuación.

En proteasas alcalinas, se utilizó el método descrito por Walter (1984) usando caseína (1%) como sustrato con una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7.5. Para proteasas ácidas, la técnica descrita por Anson (1938) usando hemoglobina (1%) como sustrato y sustituyendo las soluciones amortiguadoras de Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7.5 por Glicina-HCl 0.1M a pH 2.0. A una temperatura de 37 °C, el tiempo de incubación en ambos casos fue de 15 minutos para las proteasas ácidas y de 10 minutos para las alcalinas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Para los análisis de actividad de tripsina, se empleó el método de Erlanger *et al.* (1961) usando como sustrato BAPNA 1mM (N- α -benzoyl-DL-arginina 4-nitroanilida) en buffer Tris-HCl 50 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 8.2. El BAPNA fue previamente diluido en 100 μ l de dimetilsulfoxido (DMSO). Para iniciar la reacción, se mezclaron 560 μ l del sustrato con 10 μ l

Cuadro 1. Formulación de las dietas experimentales, sustituyendo la pasta de soya con harina de *Cannaivalia ensiformis* cocida usadas durante la evaluación in vivo en *Oreochromis niloticus*.

INGREDIENTE (G 100 G ⁻¹ DIETA)	100%PS-0%HCE	75%PS- 25%HCE	50%PS- 50%HCE	25%PS- 75% HCE	0%PS-100%HCE
Harina de soya 44 % ^a	315	231	156	81	0
Harina C. ensiformis cocida ^c	0	99	195	292.5	390
Harina de sorgo 9% ^b	375	352.5	331.5	309	285
Harina de carne 50% ^a	390	390	390	390	390
H. de pescado ^a	210.0	217.5	217.5	217.5	225.0
Aceite de pescado ^d	90	90	90	90	90
Aceite de soya ^e	45	45	45	45	45
Grenetina ^f	30	30	30	30	30
Premezcla de vitaminas ^g	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
Premezcla de minerales ^g	15	15	15	15	15
Vitamina C ^h	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Análisis químico (g / 100 g materia seca)					
Proteína (%)	52.64	50.42	48.89	47.73	46.50
Extracto etéreo (%)	19.11	18.34	17.55	16.76	14.23
Fibra cruda (%)	0.37	0.73	1.83	2.69	2.79
Cenizas (%)	12.22	11.92	11.37	10.93	10.50
Extracto libre de N (%)	15.67	18.58	20.36	21.89	25.99
Energía (cal/g)	5146.69	5071.57	5020.13	4998.22	4953.92

^a Proteínas Marinas y Agropecuarias, S. A. de C. V., Guadalajara, Jalisco, México; ^b GALMEX Comercializadora de Insumos Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, México; ^c Empresa comercializadora Teapa, Tabasco, México; ^d Sigma - Aldrich # catálogo F-8020; ^e Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, México; ^f D' gari, Productos alimenticios y dietéticos relámpago, S. A. de C. V., Tlalpan, México D. F.; ^g Pedregal (para trucha Silver Cup), Toluca, Estado de México; ^h México; ROVIMIX R C-EC (Roche) agente activo de 35%.

del extracto enzimático y se incubó el complejo por 5 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo adicionando 160 µl de ácido acético a 30%. La absorbancia fue medida a 410 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

En el caso de quimotripsina, se determinó por el método de Asgeirsson y Bjarnason (1991) usando como sustrato BTEE (N-benzoil-L-tirosina etilester) 5 mM en buffer Tris-HCl 44.4 mM + NaCl 55.5 mM pH 7.8. Se colocaron 623 µl de buffer directamente en la celda de cuarzo del espectrofotómetro y se calibró a cero. Posteriormente, se agregaron 70 µl del sustrato y se leyó la absorbancia a 256 nm cada 20 segundos durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 µl de extracto multienzimático y nuevamente se leyó la absorbancia cada 20 s por 2 min. El ensayo se realizó por quintuplicado; el delta de absorbancia se calculó como la diferencia entre la absorbancia de la reacción catalizada y la absorbancia del sustrato una vez que ambos se habían estabilizado.

Análisis estadístico

Para la evaluación del crecimiento en peso se utilizó un análisis de varianza de una vía, al cumplir los postulados de normalidad y homoscedasticidad. Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. Los índices de eficiencia alimentaria, las variables de crecimiento y supervivencia y las actividades enzimáticas fueron evaluados con una prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente, cuando se encontró diferencia significativa, se realizó una prueba *a posteriori* de Nemenyi, usando un valor de significancia de 0.05. El programa estadístico ocupado fue el STATISTICA™ v 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Terminado el experimento de crecimiento (45 días), se observó una supervivencia de 100% en T1, T2 y T3,

Cuadro 2. Índices de eficiencia alimentaria (IEA), variables de crecimiento y porcentaje de supervivencia de alevines de *O. niloticus* alimentados con las dietas de harina de *Cannavalia ensiformis* cocida (promedio \pm DE).

ÍNDICES	PORCENTAJE DE INCLUSIÓN DE HARINA COCIDA DE <i>C. ENSIFORMIS</i> (%)				
	100%PS-0%HCE	75%PS-25%HCE	50%PS-50%HCE	25%PS-75%HCE	0%PS-100%HCE
Wi	0.94 \pm 0.10	0.97 \pm 0.15	0.94 \pm 0.02	1.06 \pm 0.06	0.95 \pm 0.10
Wf	9.16 \pm 0.83	5.27 \pm 0.97	4.19 \pm 0.25	4.29 \pm 0.23	3.86 \pm 0.48
LF	8.13 \pm 0.34	6.85 \pm 0.44	6.24 \pm 0.05	6.26 \pm 0.08	6.13 \pm 0.22
AWG	8.22 \pm 0.81	4.31 \pm 0.82	3.25 \pm 0.23	3.23 \pm 0.20	2.92 \pm 0.38
FCR	4.42 \pm 0.14	2.07 \pm 0.04	2.38 \pm 0.21	2.68 \pm 0.20	2.54 \pm 0.07
SGR	5.43 \pm 0.27	4.03 \pm 0.07	3.56 \pm 0.10	3.33 \pm 0.12	3.35 \pm 0.04
SR (%)	100	100	100	91.1	94.4
K	1.705 \pm 0.09	1.633 \pm 0.03	1.726 \pm 0.09	1.748 \pm 0.07	1.675 \pm 0.03
FE	0.23 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01	0.42 \pm 0.04	0.38 \pm 0.03	0.39 \pm 0.01

Ganancia absoluta en peso (AWG, g pez⁻¹) = Wf (g) - Wi (g); la tasa de crecimiento específico (SGR, %) = 100 (lnWf - lnWi) / T, donde: Wi y Wf son el peso inicial y final del pez, respectivamente, y T es el número de días en el periodo de alimentación; el factor de conversión de alimento (FCR) = alimento seco entregado (g) / ganancia en peso húmedo (g); el factor de condición (K) = ((peso final (g) / longitud estándar (cm))³ x 100); la eficiencia del alimento FE = (peso final - peso inicial) / alimento consumido y supervivencia SR (%) = organismos finales / organismos iniciales x 100.

mientras que T4 y T5 presentaron un 91.1 y 94.4% de supervivencia, respectivamente. Los resultados de los parámetros Wf, Lf, AWG y SGR de los tratamientos T1 y T2 fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos. El T2 obtuvo valores de FCR (2.07 \pm 0.04) y FE (0.48 \pm 0.01), los cuales fueron estadísticamente significativos con respecto a los demás tratamientos de inclusión de *C. ensiformis* cocida ($p < 0.05$) (cuadro 2). En todos los tratamientos, los valores alcanzaron su mayor rendimiento conforme decrecían los niveles de concentración de *C. ensiformis* cocida en la dieta, de manera que existió una relación indirecta entre la cantidad de *C. ensiformis* cocida contenida en la dieta y el crecimiento de *O. niloticus* (figura 1).

En cuanto a la actividad enzimática, la mayor actividad de las proteasas ácidas se presentó en el T1, seguido de T2 y T3, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre estos tratamientos (figura 2). Las proteasas alcalinas mostraron mayor actividad en T1 seguidas de T2, con diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$) (figura 3). Con respecto a la tripsina, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (figura 4), mientras que, en quimotripsina, se presentó una mayor actividad en T5 seguida de T4, T3 y T2, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (figura 5).

La cannavalia es una leguminosa con un alto potencial como fuente de energía, proteínas, vitaminas

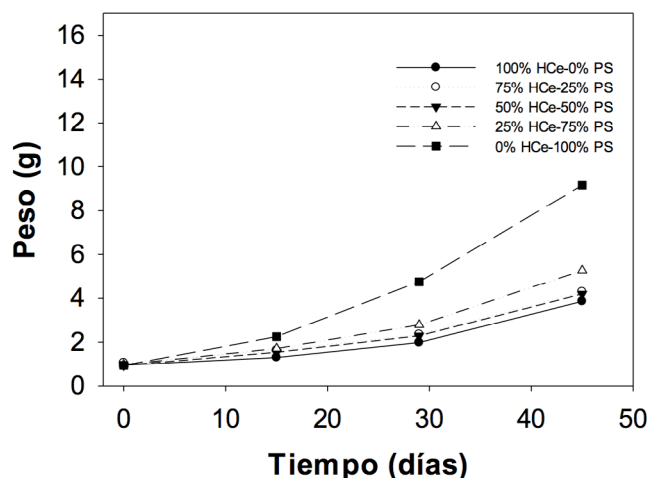


Figura 1. Crecimiento en peso promedio (g \pm DE) de alevines de *Oreochromis niloticus* alimentados con las dietas de harina de *Cannavalia ensiformis* cocida.

y minerales para el cultivo de peces. Sin embargo, presenta algunos FAN que limitan su utilización en la elaboración de dietas para peces (Fagbenro *et al.*, 2007; Akande y Fabiyi, 2010; Anyanwu *et al.*, 2012). El efecto de los antinutrientes presentes en las fuentes de proteínas vegetales ya ha sido reportado por Alarcón *et al.* (1999), Moyano-López *et al.* (1999), El-Sayed *et al.* (2000), Francis *et al.* (2001), Chong *et al.* (2002), Pérez *et al.* (2003), Elemo *et al.* (2011), cuyos resultados son muy variados y dependen del tipo de leguminosa,

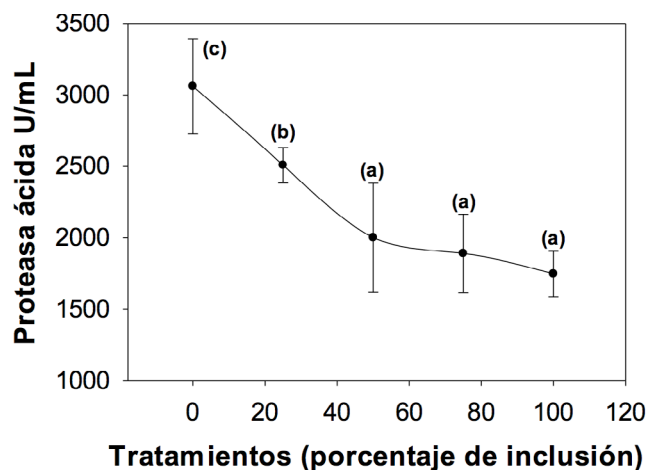


Figura 2. Actividad enzimática digestiva de proteasas ácidas en alevines de *Oreochromis niloticus* alimentados con las dietas de harina de *Cannavalia ensiformis* cocida.

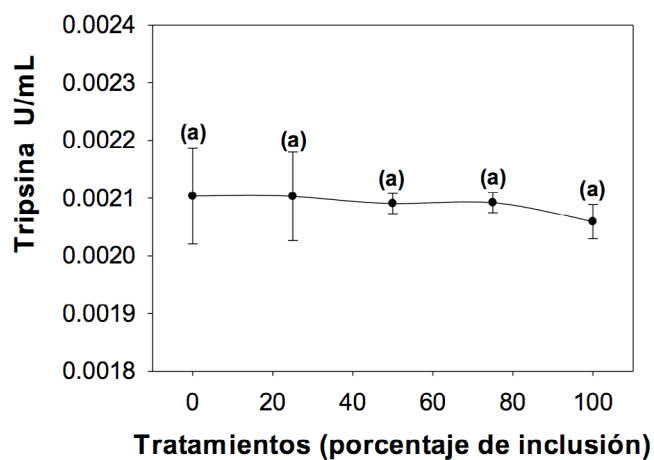


Figura 4. Actividad enzimática digestiva de tripsina en alevines de *Oreochromis niloticus* alimentados con las dietas de harina de *Cannavalia ensiformis* cocida.

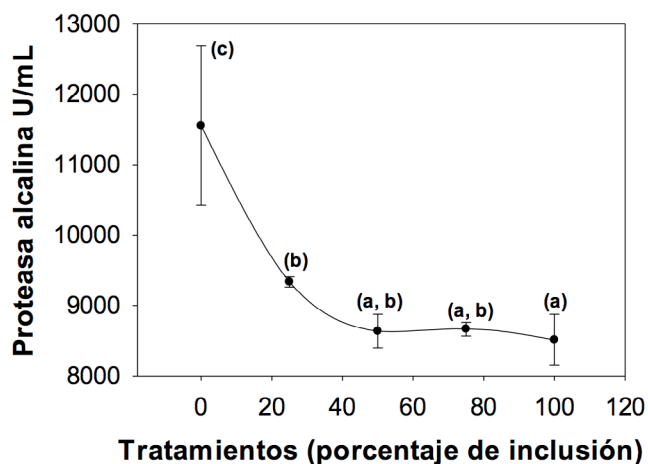


Figura 3. Actividad enzimática digestiva de proteasas alcalinas en alevines de *Oreochromis niloticus* alimentados con las dietas de harina de *Cannavalia ensiformis* cocida.

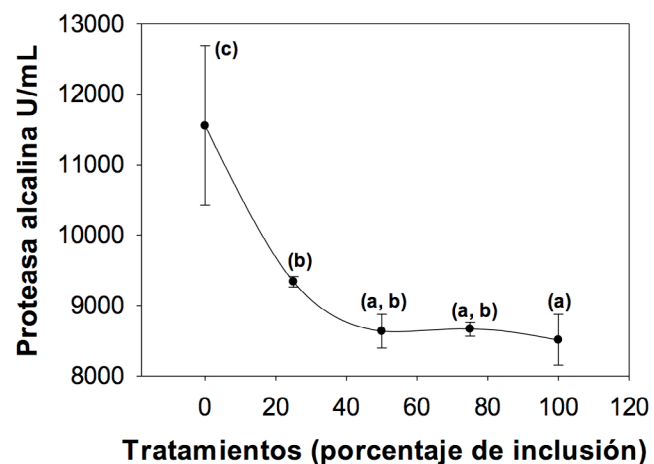


Figura 5. Actividad enzimática digestiva de quimotripsina en alevines de *Oreochromis niloticus* alimentados con las dietas de harina de *Cannavalia ensiformis* cocida.

ya sea por la presencia de sustancias que limitan la acción de las enzimas sobre su sustrato (lectinas) o la presencia de inhibidores como los antitripsinógenos, entre otros.

En este estudio se observó que el crecimiento de *O. niloticus* disminuía con respecto al incremento de inclusión de harina *C. ensiformis* en la dieta, lo cual ya ha sido reportado por Martínez-Palacios *et al.* (1988), Akinbiyi (1992), Abdo De la Parra *et al.* (1998), Olivera-Novoa y Olivera-Castillo (2000), Osuigwe *et al.* (2002), Anyanwu *et al.* (2012), Okomoda *et al.* (2016), Tihamiyu *et al.* (2016). Sin embargo y debido a la calidad nutricional de las harinas de leguminosas, se han utilizado diferentes métodos para la eliminación

de antinutrientes; entre ellos, el tratamiento térmico (Garg *et al.*, 2002; Thiessen *et al.*, 2003; Urbano *et al.*, 2003; Undesi *et al.*, 2007; Akande y Fabiyi, 2010; Ndidi *et al.*, 2014; Okomoda *et al.*, 2016; Tihamiyu *et al.*, 2016) y el tratamiento con solventes de ácido orgánico en la harina (Das-Purkayastha *et al.*, 2014). A partir de éstos, se ha recomendado una sustitución de 25% de *C. ensiformis* para dietas en peces; sin embargo, no existen estudios enfocados en el efecto de esta harina sobre la actividad enzimática de los peces en estudio.

Las actividades enzimáticas de proteasas ácidas y alcalinas mostraron una disminución respecto al aumento del porcentaje de inclusión de *C. ensiformis*. Esto es similar a los reportes realizados por Francis *et*

al. (2001), quienes reportan que la disminución de la actividad de proteasas alcalinas podría deberse a que la retroalimentación positiva pancreática esté siendo afectada por los inhibidores de la fuente vegetal como un efecto post-ingesta. La tripsina presentó una actividad constante en todos los tratamientos, lo cual puede indicar que el tratamiento térmico al que se sometió la leguminosa *C. ensiformis* fue suficiente para disminuir algunos componentes antinutricionales de inhibición de tripsina (Akande *et al.*, 2010; Doss *et al.*, 2011; Okomoda *et al.*, 2016; Tiamiyu *et al.*, 2016). No obstante, también puede deberse a una sobre-regulación de tripsina como una necesidad del pez de aprovechar los nutrientes presentes en la dieta, pues la proteína dietaria puede estimular al páncreas para regular la secreción de tripsina (Bakke *et al.*, 2011; Rodiles *et al.*, 2012; García-Meilán *et al.*, 2013), la cual participa en la degradación proteica y en la liberación de aminoácidos utilizados en el crecimiento, reproducción y energía de los peces (Al-Saraji y Nasir, 2013). Por otro lado, la actividad de quimotripsina incrementó conforme aumentaba el porcentaje de inclusión de *C. ensiformis*, resultados que también pueden deberse a que muchos peces tienden la capacidad de contrarrestar la presencia de inhibidores de proteasas incrementando la producción de tripsina y quimotripsina (Francis *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

El mejor nivel de inclusión de *Cannavalia ensiformis* cocida corresponde a 25%. Los FAN tienen efecto adverso sobre la actividad enzimática de *O. niloticus* cuando se sobrepasan esos valores, lo que se refleja en el crecimiento que resulta inversamente proporcional al porcentaje de inclusión de *C. ensiformis*. Se recomiendan más análisis de tratamientos químicos y físicos que permitan eliminar los FAN no termoestables y con ello sustituir la harina de pasta de soya en dietas experimentales, como fuentes de proteína alterna hacia el diseño de dietas para *O. niloticus*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y a la Organización de Estados Americanos (OEA), por el apoyo mediante la beca otorgada durante la realización de esta investigación. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), donde se realizó estancia de investigación. Al proyecto "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.

LITERATURA CITADA

- Abdo de la Parra, M. I., C. A. Martínez-Palacios, I. E. Martínez-Rodríguez, B. González-Rodríguez, M. A. Olvera, M. L. Vásquez, C. Chávez-Sánchez. 1998. Advances in the use of the bean *Canavalia maritima* as a possible source of protein in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: H. Grizel, P. Kestemont (eds.). Abstracts of the International Conference - Aquaculture Europe '98. European Aquaculture Society, Special Publication No. 26. Oostende, Belgium. pp. 2-3.
- Akande, K. E., E. F. Fabiyi. 2010. Effect of processing methods on some antinutritional factors in legume seeds for poultry feeding. *International Journal of Poultry Science* 9(10): 996-1001.
- Akinbiyi, A. 1992. The use of thermally-processed jack bean (*Canavalia ensiformis*) in Nile tilapia diets. M. Sc. Thesis Dissertesion, University of Ibadan, Nigeria. 70 pp.
- Alarcón, F. J., F. J. Moyano, M. Díaz. 1999. Effect inhibitors presents in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* 12(4): 233-238.
- Alegbeleye, W. O., A. Oresegun, O. D. Ajimoti. 2001. An assessment of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) meal as an ingredient in the diets for *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fingerlings. In: Eyo A. A. (ed.). *Fish Nutrition and Fish Feed Technology*. pp. 92-97. Proceedings of a National Symposium held at the National Institute for Oceanography and Marine Research (NIOMR), Lagos, Nigeria, October 1999, Proceedings Series No. 1 NIOMR, Lagos.
- Al-Saraji, A. Y. J., N. A. N. Nasir. 2013. Effect of different dietary proteins and fats on the digestive enzymes activities in the common carp fingerlings (*Cyprinus carpio* L.) reared in floating cages. *Mesopotamian Journal of Marine Science* 28(2): 121-130.
- Anduaga-Cota, R., A. G. Cota-Gastélum, M. R. Falcón-Villa, G. Yáñez-Farías, M. J. Barrón-Hoyos. 2002. Medición de dureza en frijol cocido con una celda de extrusión por alambres: propuesta de una celda de menor tamaño. *Memorias del IV Congreso del Noroeste en Ciencias Alimentarias y Biotecnología*. Hermosillo, México.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- Anyanwu, D. C., E. N. Umeh, J. I. Offor. 2012. Growth and nutrient utilization of *Clarias gariepinus* fed dietary levels of jackbean (*Canavalia ensiformis*) meal. *Pakistan Journal of Nutrition* 11(11): 1033-1036.
- Asgeirsson, B., J. B. Bjarnason. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99B (2): 327-335.
- Chong, A. S. C., G. R. Hashim, A. B. Ali. 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods. *Aquaculture Nutrition* 8: 229-238.
- Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, I. M. Mc Callum, D. Hickling. 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisumsativum*) meals and canola meal (*Braica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196: 87-104.
- Das-Purkayastha, M., J. Gogoi, D. Kalita, P. Chattopadhyay, K. S. Nakhuru, D. Goyary, C. L. Mahanta. 2014. Physicochemical and functional properties of rapeseed protein isolate: influence of antinutrient removal with acidified organic solvents from rapeseed meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(31): 7903-7914.
- Doss, A., M. Pugalenti, V. G. Vadivel, G. Subhashini, R. A. Subash. 2011. Effects of processing technique on the nutritional composition and antinutrients content of under utilized food legume *Canavalia ensiformis* L.DC. *International Food Research Journal* 18(3): 965-970.
- Dimes, L. E., N. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility: Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 108: 349-362.
- Elemo, G. N., B. O. Elemo, O. L. Erukainure, 2011. Activities of some enzymes, enzyme inhibitors and antinutritional factors from the seeds of sponge gourd (*Luffa aegyptiaca* M.). *African Journal of Biochemistry Research* 5(3): 86-89.
- El-Sayed, A. F. M., I. M. Martínez, F. J. Moyano. 2000. Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile Tilapia using *in vitro* assays. *Aquaculture International* 8: 403-415.
- Erlanger, B., N. Kokowsky, W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.
- Fagbenro, O. A., E. O. Adeparusi, W. A. Jimoh. 2007. Evaluation and nutrient quality of detoxified jackbean (*Canavalia ensiformis*) seeds, cooked in distilled water or trona solution, as a substitute for soybean meal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, diets. *Journal of Applied Aquaculture* 19(2): 83-100.
- Francis, G., H. Makkar, K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197-227.
- García-Meilán, I., J. M. Valentín, R. Fontanillas, M. A. Gallardo. 2013. Different protein to energy ratio diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects on digestive and absorptive processes. *Aquaculture* 412(413): 1-7.
- Garg, S. K., A. Kalla, A. Bhatnagar. 2002. Evaluation of raw and hydrothermally processed leguminous seeds as supplementary feed for the growth of two Indian major carp species. *Aquaculture Research* 33: 151-163.
- Kikuchi, K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 179: 3-11.

- Köprücü, K., Y. Özdemir. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 250: 308-316.
- Martínez-Palacios, C. A., R. Galván-Cruz, M. A. Olvera-Novoa, C. Chávez-Martínez. 1988. The use of jack bean (*Canavalia ensiformis* Leguminosae) meal as a partial substitute for fish in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Cichlidae). *Aquaculture* 68: 165-175.
- Martínez-Palacios, C. A., M. C. Chávez-Sánchez, M. A. Olvera-Novoa, M. I. Abdo de la Parra. 2000. Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Manejo Ambiental del CIAD, A.C. Mazatlán, Sinaloa, México. *Avances en Nutrición Acuícola III*. pp. 279-324.
- Moyano, F. J., M. Díaz, F. J. Alarcón, M. C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology Biochemistry* 15: 121-130.
- Moyano-López, F. J., M. Díaz, F. J. Alarcón-López. 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Soleas neegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122: 327-332.
- Ndidi, U. S., C. U. Ndidi, A. O. Aliyu, M. F. G. Billy, O. Okpe. 2014. Proximate antinutrients and mineral composition of raw and processed (boiled and roasted) *Sphenostylis stenocarpa* seeds from southern Kaduna, Northwest Nigeria. *ISRN Nutrition Article ID 280837*: 1-9.
- Okomoda, V. T., L. O. Tiamiyu, S. G. Uma. 2016. Effects of hydrothermal processing on nutritional value of *Canavalia ensiformis* and its utilization by *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research* 3(1): 214-219.
- Olvera-Novoa, M. A., L. Olivera-Castillo. 2000. Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces. Pp. 327-348. En: Civera-Cerecedo, R., C. J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie & L. E. Cruz-Suárez (Eds.) *Avances en nutrición acuícola IV*. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, La Paz, México.
- Osuigwe, D. I., A. I. Obiekezie, J. O. Ogunji. 2002. Preliminary evaluation of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) seed meal as a substitute for fishmeal in diets for *Clarias gariepinus* In: Challenges to organic farming. *Deutscher Tropentag*. Oct. 9-11, 2002. Kassel Witzenhause.
- Pérez, J. J., G. A. Wicki, F. J. Moyano, F. J. Alarcón. 2003. 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*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003: 442-454.
- Rodiles, A., E. Santigosa, M. Herrera, I. Hachero-Cruzado, M. L. Cordero, S. Martínez-Llorens. 2012. Effect of dietary protein level and source on digestive proteolytic enzyme activity in juvenile *Senegalese sole*, *Soleas neegalensis* Kaup 1850. *Aquaculture International* 20: 1053-1070.
- Rosenthal, G. A. 1992. Non-Protein amino acids in the life processes of higherplants. pp. 249-261. In: Singh, B. K. (ed.), *Biosynthesis and Molecular Regulation of AminoAcids in Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, USA.
- Saunders, R. M., M. A. Conner, A. N. Booth, E. M. Bickoff, G. O. Kohler. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods. *Journal of Nutrition* 103: 530-535.
- Tacon, A. G. J., J. L. Webster, C. A. Martínez. 1984. Use of solvent extracted sunflower seed meal in complete diets for fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 43: 381-389.
- Tiamiyu, L. O., V. T. Okomoda, P. O. Akpa. 2016. Nutritional profile of toasted *Canavalia ensiformis* seed and its potential as partially replacement for soybean in the diet of *Clarias gariepinus*. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 20(2): 12-17.
- Thiessen, D. L., G. L. Campbell, P. D. Adelizi. 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition* 9: 67-75.
- Udedibie, A. B. I. 1990. Nutritional evaluation of jackbean (*Canavalia ensiformis*) for poultry industry in Nigeria. *AMBIO* 19: 361-365.
- Udedibie, A. B. I., C. O. Nkwocha. 1990. Comparative study of jack bean (*C. ensiformis*) and sword bean (*C. gladiata*) as protein supplements for young broiler chicks. *Agriculture Journal* 24: 7-14.
- Udemi, E. A., F. C. Ekwu, J. N. Isinguzo. 2007. Antinutrient factors of vegetable cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. *Pakistani Journal of Nutrition* 6 (2): 194-197.
- Urbano G., P., E. Aranda, A. Gómez-Villalva, J. M. Frejnel Porres, J. Frías, C. Vidal-Valverde, M. López-Jurado. 2003. Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diet after mild hydrothermal and with and without added phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2415-2420.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. Pp. 270-277. Bergmeyer, H. J. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. V. Verlag Chemie. Weinham, Germany.
- Wyss, U., H. Bichel. 1988. Ripe beans of *Canavalia ensiformis* (jack bean) as feed ingredient for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology* 20: 325-326.