

Characterization and improvement of *Cannavalia ensiformis* meal as balanced feed for *Oreochromis niloticus*.

Caracterización y mejoramiento de la harina de *Cannavalia ensiformis* como alimento balanceado para *Oreochromis niloticus*.

Fanny J. De la Cruz-Alvarado¹, Carlos Alfonso Álvarez-González^{1*}, Héctor Nolasco-Soria², Rafael Martínez-García^{1*}, José Manuel Piña-Gutiérrez¹, Bartolo Concha-Frías¹, Carlos Alfonso Frías-Quintana³, Emyr Peña^{1,4}

Recibido: 01 de febrero de 2019.

Aceptado: 16 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

RESUMEN

Antecedentes. La leguminosa *Cannavalia ensiformis* es una excelente fuente de energía, proteína, vitaminas y minerales para ser utilizadas en la alimentación animal; sin embargo, contiene factores antinutricionales (FAN), que limitan su utilización en la alimentación de peces. **Objetivo.** En este estudio se evaluaron 7 harinas obtenidas de los procesos de hidratación, extracción ácida, decorticado, cocción, germinado, autoclave y desgrasado de las semillas de *C. ensiformis* como medios de eliminación de FAN. **Métodos.** La calidad nutricional de las harinas fueron corroborados con análisis químicos proximales y digestibilidad *in vitro*, determinando el grado de hidrólisis (GH, %) de las harinas de *C. ensiformis* obtenidas mediante pH STAT, se calculó la liberación de aminoácidos totales (AALT, $\mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando extractos multienzimáticos de estómago e intestino de juveniles de *O. niloticus*. **Resultados.** Los valores de GH ácido/alcalino para la harina de *C. ensiformis* cocida fue de $0.76 \pm 0.01\%$ / $6.04 \pm 0.37\%$, siendo significativamente mayor con respecto a las otras harinas. Los valores de AALT ácido/alcalino ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de esta harina cocida (0.02 ± 0.006 / 0.40 ± 0.02) fueron significativamente mayores en la fase alcalina en relación a las otros tratamientos. **Conclusión.** Se detectó que la harina cocida de *C. ensiformis*, permite ser utilizada como fuente de proteína en dietas para *Oreochromis niloticus*.

Palabras clave: *Cannavalia ensiformis*, digestibilidad *in vitro*, harinas procesadas, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Background. The legume *Cannavalia ensiformis* is an excellent source of energy, protein, vitamins and minerals to be used in animal production; however, it contains antinutritional factors (ANF), which limit its use for fishes. **Goals.** In this study 7 flours obtained from the processes of hydration, acid extraction, decorticating, cooking, germination, autoclaving and degreasing of the seeds of *C. ensiformis* were evaluated as means of elimination of ANF. **Methods.** The nutritional values of the meals were corroborated with proximal chemical analysis and *in vitro* digestibility, determining the degree of hydrolysis (GH%) of the flours of *C. ensiformis* obtained by pH STAT, the release of total amino acids (TAAL, $\mu\text{g mL}^{-1}$) was calculated, using multienzymatic extracts of stomach and intestine of *O. niloticus* juveniles. **Results.** The acidic/alkaline GH values for cooked *C. ensiformis* flour were $0.76 \pm 0.01\%$ / $6.04 \pm 0.37\%$, being significantly higher with respect to the other flours. The values of acidic/alkaline TAAL ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of this cooked flour (0.02 ± 0.006 / 0.40 ± 0.02) were significantly higher in the alkaline phase in relation to the other treatments. **Conclusion.** We detected that cooked meal of *C. ensiformis*, allow to be used as a source of protein in diets for *Oreochromis niloticus*.

Keywords: *Cannavalia ensiformis*, *in vitro* digestibility, *Oreochromis niloticus*, processed flours.

¹ Laboratorio de Acuicultura Tropical, DA-CBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 86139. México.

² Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23090. México.

³ División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Nacajuca-Jalpa de Méndez R/a Rivera Alta, Jalpa de Méndez, Tabasco, 86200. México.

⁴ Cátedras, CONACYT

*Corresponding author:

Carlos Alfonso Álvarez-González: e-mail: alvarez_alfonso@hotmail.com, Rafael Martínez-García: e-mail: biologomartinez@hotmail.com

To quote as:

De la Cruz-Alvarado F. J., C. A. Álvarez-González, H. Nolasco-Soria² R. Martínez-García, J. M. Piña-Gutiérrez, B. Concha-Frías, C. A. Frías-Quintana, E. Peña. 2019. Characterization and improvement of *Cannavalia ensiformis* meal as balanced feed for *Oreochromis niloticus*. *Hidrobiológica* 29 (3): 170-179.

INTRODUCCIÓN

Cannavalia ensiformis, L. DC. es una leguminosa que destaca por su contenido nutrimental (Sandoval *et al.* 2001), la cual es sumamente resistente a la sequía e inmune a pesticidas (FAO, 2012), el género *Cannavalia* está compuesto por 48 especies, que son originarios de las regiones tropicales donde están ampliamente distribuidas (Fagbenro *et al.* 2007). Su potencial nutricional ha sido bien estudiado en organismos monogástricos, aves de corral (Wyss & Biczaj, 1988; Udedibie, 1990; Udedibie & Nkwocha, 1990) y peces (Martínez-Palacios *et al.* 1988; Akinbiyi, 1992; Abdo De la Parra *et al.* 1998; Osuigwe *et al.* 2002; Fagbenro *et al.* 2007). *C. ensiformis* es una fuente potencial de energía, proteínas, vitaminas y minerales; sin embargo, este enorme potencial nutritivo se ve reducido por factores antinutricionales (FAN), que limitan su utilización en la elaboración de dietas para peces (Martínez-Palacios *et al.* 1998; Abdo de la Parra *et al.* 1998; Osuigwe *et al.* 2002, Fagbenro *et al.* 2007; Akande *et al.* 2010). Para la utilización de esta leguminosa como ingrediente para la alimentación animal se han estudiado diversos procesos de eliminación de FAN, para mejorar su digestibilidad. Asimismo, se han desarrollado métodos para medir la digestibilidad de la proteína contenida en el alimento, como es el método "in vitro" de pH-STAT el cual permite un estudio detallado del proceso de hidrólisis de la proteína durante la digestión a través de la cuantificación de los aminoácidos y péptidos liberados (Dimes & Haard, 1994; Oña *et al.* 2003; Moyano *et al.* 2014), permitiendo evaluar la digestibilidad y selectividad de los ingredientes dietarios (Tacon 1995; Alarcón *et al.* 2002) que pueden utilizarse en el cultivo de peces. Se han realizados estudios de digestibilidad *in vitro* en especies de peces como *Paralabrax maculatofasciatus*, Steindachner, 1868, *Atractosteus spatula*, Lacepède, 1803, *Chirostoma estor*, Jordan, 1880, *Centropomus undecimalis*, Bloch, 1792, *Atractosteus tropicus*, Gill, 1863 y *Cichlasoma urophthalmus*, Günther, 1862, entre otros (Álvarez-González 2003; Aguilera *et al.* 2005; Ávalos-Sánchez, 2006; Concha-Frías, 2008; Frías-Quintana *et al.* 2010; Cuenca-Soria *et al.* 2013), que han permitido crear o mejorar sus formulaciones alimenticias. Este estudio se diseñó para evaluar la eliminación de FAN mediante los procesos de hidratación, extracción ácida, decortinado, cocción, germinado, autoclave y desgrasado de las semillas de *C. ensiformis*, utilizando análisis químicos proximales y digestibilidad *in vitro* de las harinas obtenidas de estos procesos, con la finalidad de sustituir parcialmente la harina de pasta de soja en dietas de *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se dividió en dos etapas: la primera comprendió la elaboración de las harinas de las semillas de *C. ensiformis* a través de 7 diferentes procesos de eliminación de FAN y la segunda consistió en la determinación de la digestibilidad *in vitro* mediante pH STAT de las harinas obtenidas previamente utilizando extractos enzimáticos digestivos de juveniles de *O. niloticus*.

Etapas 1: Elaboración de las harinas de las semillas de *C. ensiformis*. Las semillas de *C. ensiformis* fueron obtenidas del rancho el Recreo en Teapa, Tabasco, México, cosechadas manualmente y empaquetadas en bolsas de polietileno con capacidad de 10 Kg; para lo cual no se utilizó ningún tratamiento de conservación. Este estudio de procesamiento y análisis proximales fueron realizados en el Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, del Centro de Investi-

gaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, B.C.S. Para los procesos de hidratación, extracción con ácido, decortinado, cocido y autoclavado se utilizaron 200 g de semillas de *C. ensiformis* para cada tratamiento. Todos los ensayos fueron realizados por cuadruplicado.

Hidratación. Las semillas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y fueron hidratadas con un litro de agua destilada, en agitación constante durante 36 h, con recambio total de agua destilada cada 12 h.

Extracción con ácido. Las semillas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y fueron hidratadas en un litro de agua destilada durante 24 h, con un recambio total de agua destilada a las 12 h, finalmente fueron colocadas en una solución de HCl 20 mM por 12 h, todo este proceso se realizó con agitación constante.

Decortinado. Las semillas fueron trituradas con un molino mecánico (molino café Braun KSM 2), posteriormente se eliminó la corteza de la semilla y el decortinado se almacenó en un recipiente con sellado hermético (Bautista, 2009), para la posterior preparación de la harina.

Cocción. Las semillas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y fueron hidratadas con un litro de agua destilada, durante 12 h a temperatura ambiente, luego se procedió a decantar y lavar con agua destilada. Posteriormente, fueron cocidas a ebullición durante 30 minutos utilizando una relación frijol: agua de 1:5 (Anduaga-Cota *et al.* 2002).

Germinado. Se seleccionaron 100 semillas (SCE), previamente desinfectadas con cloro al 10% por 3 minutos y lavadas en 3 tiempos de un minuto con agua destilada estéril, luego fueron colocadas en papel toalla húmeda dentro de una bolsa plástica, este proceso se realizó en una cámara UV para evitar contaminación por gérmenes. Posteriormente se trasladaron a una incubadora (Binder, modelo BD53-UL) en completa oscuridad por 27°C y 50% de humedad relativa, durante 6 días, las semillas fueron humedecidas con agua destilada estéril cada 24 horas.

Autoclavado. Las semillas fueron colocadas en un colador y sumergidas para hidratación en agua destilada por 3 minutos, seguidamente se retiró el colador y se decantó el agua; las semillas se colocaron en bolsas y expuestas en la autoclave a 121°C 15 lb por pulg², por 30 minutos.

Desgrasado. Se pesaron 2 kg de semillas y se realizó una molienda en un molino industrial (marca Pulvex. S.A. de C.V.), se tamizaron a 500 micras para homogenizar el tamaño de las partículas, acto seguido se pesaron 200 g de harina y fue introducida en un reactor de vidrio de un litro y se agregaron 400 mililitros de éter de petróleo con agitación a 120 RPM en un agitador industrial (MAXQ 3000) durante 2 h. La mezcla se filtró en un dispositivo de succión (Nolasco, 2012 patente en trámite) con la ayuda de una bomba de vacío.

Al final de los ensayos de hidratación, extracción con ácido, cocido, autoclavado, germinado y desgrasado, las muestras fueron lavadas con agua destilada, decantadas y secadas en una estufa (VWR, modelo 1680) a temperatura de 70 °C por 24 h y molidas en un pulverizador PULVEX 200, México, D. F. Posteriormente las harinas se tamizaron a 500 micras y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis según Rivas (2006).

Análisis químico proximal a las harinas procesadas de *C. ensiformis*. Se aplicaron los métodos de la AOAC (1990) para las determinaciones de: a) humedad, determinación por diferencia de peso a 70°C por 24 h; b) proteína cruda, cuantificando la concentración de nitrógeno

con el Método de DUMAS (Equipo Leco FP-528); c) extracto etéreo, usando el método de Soxtec-Avanti, TECATOR; d) fibra cruda, Método de hidrólisis sucesiva (ácido / base), y e) cenizas, determinación por diferencia de peso, previa calcinación a 500° C por 24 h. Se calculó el extracto libre de nitrógeno, por diferencia de 100% con las determinaciones anteriores.

Etapa 2: Digestibilidad in vitro. Los juveniles fueron obtenidos de un lote de reproductores de tilapia del área de reproducción del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Las larvas, fueron alimentadas con una dieta comercial hormonada para tilapia con 52% de proteína y 14% de lípidos (El pedregal Silver Cup®, México, Estado de México, Toluca) con una dosis de 60 mg de 17 α -metiltestosterona (MT) Kg de alimento⁻¹, por un periodo de 28 días. Una vez concluido el periodo de masculinización, se les suministró una dieta para tilapia con 45% de proteína y 5% de lípidos (El pedregal Silver Cup®). Los juveniles fueron mantenidos en un sistema de recirculación de agua, durante un periodo de dos semanas adicionales antes de su procesamiento. Los parámetros de la calidad del agua fueron medidos diariamente, se mantuvieron a 29 \pm 1 °C de temperatura, para el oxígeno disuelto (6.3 \pm 0.5 mg l⁻¹) se utilizó un oxímetro YSI 55 (con 138 precisión de 0.1 °C y 0.01 mg l⁻¹, California, USA) y para el pH (7.1 \pm 0.2) se utilizó un potenciómetro (Hanna Instruments, HI 98311, Rhode Island, USA).

Obtención de extractos multienzimáticos. Para estos ensayos se sacrificaron un total de 35 juveniles con una longitud promedio de 21 \pm 3 cm y un peso promedio de 177.25 \pm 4.5 g, que previamente fueron dejados en inanición por un periodo de 48 horas antes de ser sacrificados y pesados antes y después de la evisceración, posteriormente se le extrajo el estómago y el intestino por separado, los cuales fueron triturados con un homogenizador de tejidos (ULTRA TURRAX® IKA T18 Basic). Los extractos del estómago se prepararon en agua destilada ajustando el pH a 3.55 con ácido clorhídrico (0,1 M) y para los extractos del intestino el agua destilada fue ajustada con hidróxido de sodio (0,1 M) a pH de 7.95 a 4 °C. Se utilizó una relación 5:1 (5 ml de agua destilada por g de tejido). La mezcla obtenida fue colocada en tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugada a 12 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue extraído y se les ajustó el pH requerido para cada extracto, luego fueron almacenados en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su posterior análisis.

Actividad específica de enzimas estomacales e intestinales. Con el fin de conocer la cantidad de unidades de proteasa ácida en el extracto estomacal, se utilizó el método de Anson (1938), con las siguientes modificaciones: a 1 ml de hemoglobina (1 %) en tampón 0,1 M glicina - HCl a pH 2 y se le añadieron 5 μ l de extracto enzimático de estómago de *O. niloticus*. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 37 °C y la reacción se detuvo por adición de 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Después se dejó reposar la mezcla de reacción (15 a 30 minutos), se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. En el sobrenadante, se midió la cantidad de equivalentes de tirosina liberados (ABS_{280nm}) mediante un espectrofotómetro uv/visible. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ g de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (0 a 300 μ g ml⁻¹). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para determinar la actividad de las proteasas intestinales se utilizó el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984), usando como

sustrato caseína al 1% en tampón 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a pH 9. Se agregó 0,5 ml de caseína, más 0,5 ml de tampón Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM, pH 9 y 10 μ l de extracto enzimático del intestino y se incubó por 10 minutos, la reacción se detuvo con 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos y se determinó la cantidad de equivalentes de tirosina liberados según el protocolo descrito en el apartado anterior.

Evaluación de la digestibilidad in vitro ácida y alcalina en pH Stat.

Un total de 7 harinas de *C. ensiformis* como ingredientes proteínicos de origen vegetal (Tabla 1) fueron expuestas a degradación enzimática en un sistema pH Stat Titrande (Metrohm 902 Suiza), de acuerdo a Saunders *et al.* (1972), modificado por Dimes & Haard (1994), para evaluar su grado de hidrólisis (GH, %). Los ensayos de digestión ácida se realizaron en un volumen final de 5 ml de la mezcla de reacción. Cada ingrediente de prueba se resuspendió en agua destilada a una concentración de 8 mg de proteína mL⁻¹ en un vaso de 20 mL, ajustando el pH a 3.5 con HCl 0.1 N para proteasas ácidas, a esta mezcla se le agregaron 189 μ l (10 U mL⁻¹ de mezcla de reacción) de la preparación enzimática a pH 3 manteniendo la mezcla de reacción en agitación continua (500 rpm) a 37 °C durante 15 minutos. Se utilizó a la hemoglobina como ingrediente de referencia. De la misma forma se realizó la digestión alcalina, para lo cual se ajustó el pH a 7.9 con NaOH 0.1N y se le agregaron 263 μ l (100 U mL⁻¹ de mezcla de reacción) de extracto enzimático a pH 8 manteniendo en agitación continua (500 RPM) a 37 °C durante 45 minutos y se utilizó caseína como ingrediente de referencia. Se tomaron muestras de 20 μ l del vaso de reacción: en la fase ácida cada 100 s hasta los 900 s y en la fase alcalina cada 250 s hasta los 2 700 s y conservadas a -20 °C para determinar los aminoácidos libres totales (AALT). La unidad de tiempo previa a la adición de extracto multienzimático, fue definida como el tiempo cero. A partir del gasto de HCl (Fase ácida) y de NaOH (Fase alcalina) se determinó (GH), el cual se expresa como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}). Donde el valor de (h) = [consumo de base en ml (Vb)] x [normalidad de la base (Nb)] x [1 x (constante de disociación de los grupos α -NH₂ y α -COOH respectivamente)⁻¹] x [1 x (masa de proteína en la mezcla de reacción)⁻¹]. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis de aminoácidos libres totales (AALT). Las muestras pre-hidrolizadas (20 μ l) del vaso de reacción, se fijaron con 20 μ l de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12% y fueron analizadas mediante la técnica de *o*-phtaldialdehído (OPA), de acuerdo con Church *et al.* (1983), que consiste en la unión de la parte amino terminal de los aminoácidos con el reactivo OPA. La solución de OPA está compuesta de 50 ml de tetraborato sódico 0,1 M; 5 mL de SDS al 20 %; 80mg de *o*-phtaldialdehído (disueltos en 1 mL de metanol) y 0,2 mL de β -mercaptoetanol, aforando con agua destilada hasta 100 mL de volumen final. Las muestras prehidrolizadas que fueron mezcladas con TCA se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos. Se tomaron 10 μ l del sobrenadante y se añadieron directamente a 1 mL del reactivo OPA, mezclado brevemente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 340 nm y se comparó con un estándar elaborado con l-leucina (0.5 mg mL⁻¹) concentraciones crecientes de 0 a 20 μ g ml⁻¹ para la determinación de la cantidad de aminoácidos libres totales en las muestras. Los resultados se expresan como μ g de equivalentes de l-leucina liberados por cada μ g de proteína. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Tabla 1. Composición proximal (%) de harinas de *Cannavalia ensiformis*, L. DC, utilizando diferentes métodos de procesamiento.

Parámetros	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
Harina Desgrasado	5.13 ± 0.21	32.57 ± 0.21	0.48 ± 0.08	11.31 ± 0.05	4.16 ± 0.09	51.47	4178.29 ± 6.76
Harina E. ácido	6.61 ± 0.20	32.41 ± 0.16	1.93 ± 0.03	9.78 ± 0.10	3.33 ± 0.08	52.54	4224.84 ± 5.06
Harina Autoclavado	7.40 ± 0.23	31.59 ± 0.22	2.07 ± 0.06	10.05 ± 0.05	4.10 ± 0.05	52.19	4243.29 ± 1.50
Harina Cocción	9.07 ± 0.08	32.37 ± 0.27	1.98 ± 0.10	9.91 ± 0.06	3.28 ± 0.03	52.46	4305.83 ± 3.20
Harina Decortinado	11.23 ± 0.10	39.38 ± 0.14	2.17 ± 0.03	0.80 ± 0.00	4.15 ± 0.03	53.51	4330.05 ± 7.59
Harina Hidratación	6.46 ± 0.28	32.26 ± 0.17	2.13 ± 0.10	10.71 ± 0.21	3.31 ± 0.11	51.59	4275.90 ± 2.68
Harina Germinado	12.41 ± 0.29	34.39 ± 0.14	1.95 ± 0.05	9.72 ± 0.26	4.31 ± 0.04	49.63	4154.91 ± 1.00
Harina sin Tratamiento	10.18 ± 0.10	32.87 ± 0.16	2.08 ± 0.06	8.22 ± 0.15	4.04 ± 0.03	52.79	4200.69 ± 2.49

Valores promedio ± desviación estándar de 3 réplicas por muestra. Resultados expresados en base seca, excepto humedad.

Análisis estadístico. Se corroboró la normalidad y homoscedasticidad para los valores de GH y liberación de aminoácidos totales, por lo que se aplicó un análisis de varianza de una vía y pruebas posteriores de Tukey para determinar las diferencias entre los tratamientos. Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un valor de significancia de ($P < 0.05$). Así mismo para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA V7.

RESULTADOS

Análisis químico proximal. El análisis proximal de las harinas procesadas de las semillas de *C. ensiformis* se muestra en la Tabla 1.

Actividad específica de extractos multienzimáticos de estómago e intestino. Los ensayos de proteasas ácidas y alcalinas, revelaron que los juveniles de *O. niloticus*, tienen una mayor actividad de proteasas en el intestino en relación a la actividad enzimática presentada en la sección estomacal del tracto digestivo (Tabla 2). Ambos valores de actividad específica se tomaron como base para calcular el volumen de extracto multienzimático, tanto en el proceso de hidrólisis ácida, como en la alcalina.

Digestibilidad in vitro de las harinas de *C. ensiformis* como ingredientes proteínicos. Para la hidrólisis ácida se utilizaron los extractos enzimáticos estomacales de *O. niloticus* y fueron expuestos a las diferentes harinas procesadas de *C. ensiformis* mediante la técnica del pH STAT, tomando como base la hemoglobina, donde sus valores fueron considerados como el 100 % del grado de hidrólisis (GH, %). Todas las harinas mostraron valores de GH menores al 100 %, siendo la harina cocida la que presenta mayor valor de GH con respecto al resto de los tratamientos. Por otro lado, el tratamiento con ácido alcanzó el valor más bajo (Fig. 1a).

En la fase alcalina las harinas fueron expuestas a extractos multienzimáticos intestinales, utilizando los valores de la caseína como el

100 % de GH. Los resultados mostraron que la harina cocida tiene el mayor valor de GH con respecto al resto de los tratamientos, siendo el tratamiento con ácido quien mostró el valor más bajo (Fig. 1b).

En la Tabla 3, se muestran los valores de GH para cada fase (ácida y alcalina) y el valor del GH total, así mismo el porcentaje de digestibilidad alcanzado por cada una de las harinas analizadas, donde la suma del GH de la hemoglobina y la caseína, se tomaron como control y fue considerada como el 100% de la digestibilidad. Aquí podemos observar que el tratamiento por cocción presenta un GH total mayor y por encima del 50 % de digestibilidad con respecto a los demás tratamientos.

Determinación de aminoácidos libres totales mediante la técnica de OPA. En la fase ácida, el tratamiento por germinado mostró los mayores valores de AALT ($0.28 \pm 0.006 \mu\text{g mL}^{-1}$) seguidos del decortinado ($0.12 \pm 0.022 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 2a), estos valores fueron mayores a los mostrados por la hemoglobina ($0.09 \pm 0.009 \mu\text{g mL}^{-1}$), los tratamientos de cocido ($0.02 \pm 0.006 \mu\text{g mL}^{-1}$) y por autoclave ($0.03 \pm 0.012 \mu\text{g mL}^{-1}$) presentaron los valores más bajos de AALT (Tabla 4).

En la fase alcalina el tratamiento por cocción presentó valores significativamente altos ($0.40 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 2b), siendo el tratamiento por desgrasado que mostró el valor más bajo de AALT ($0.08 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabla 5), en donde la caseína presentó valores de $0.53 \pm 0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$.

DISCUSIÓN

En este estudio se aplicaron de forma independiente 7 diferentes procesos para la eliminación de FAN en semillas de *C. ensiformis*. A cada una de las harinas obtenidas de estos procesos se les evaluó el GH y los AALT. Los análisis proximales muestran que la harina cocida presenta un contenido de proteínas y grasas similares a la harina sin tratamiento. Según Okomoda *et al.* (2016), el tratamiento térmico de hasta 40 min no afecta significativamente el contenido de proteína y grasa de *C. en-*

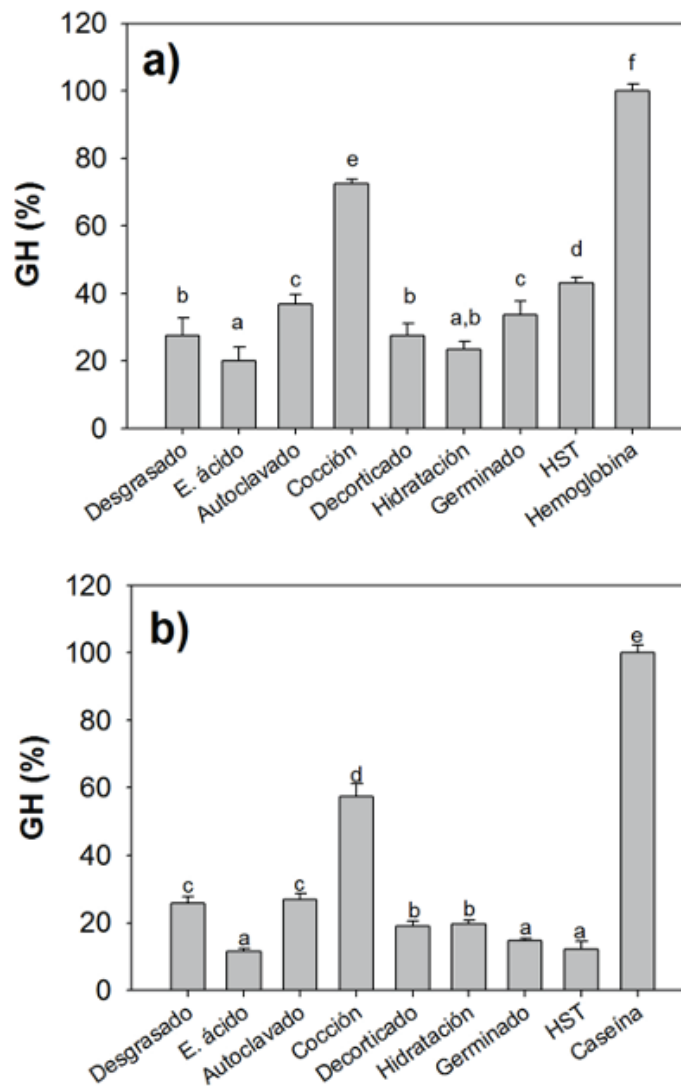


Figura 1. Valores de GH (% \pm DE) de los ingredientes proteínicos de las harinas de *Cannavalia ensiformis*: a) fase ácida, como ingrediente de referencia la hemoglobina y b) fase alcalina, como ingrediente de referencia la caseína.

siformis, pero a partir de 30 min disminuyen los contenidos de lectinas, saponinas e inhibidores de tripsina, no así la canavalina, similar a lo reportado por Tiamiyu *et al.* (2016), mediante el proceso de tostado de semillas de esta especie. Sin embargo, Ndidi *et al.* (2014) reportaron pérdidas de proteína cruda y grasa en hervidos y asados de semillas *Sphenostylis stenocarpa*, Hochst. ex A. Rich. Harms; mientras Audu & Aremu (2011), encontraron pérdidas de grasas por tratamiento térmico, pero no significativamente en proteínas de haba procesada (*Phaseolus vulgaris* L.), lo que indica que el efecto térmico depende de la composición bioquímica de las semillas y la especie a tratar, afectando no solo a los FAN sino también a los nutrientes, aunque en *C. ensiformis* solo afectó a los FAN.

Todas las harinas analizadas presentaron valores menores al 100% de digestibilidad en la fase ácida y alcalina con respecto al control. La

harina cocida mostró el valor más alto (58.73 %) de digestibilidad en relación al resto de los tratamientos, datos similares son reportados por Concha-Frías (2008), para pasta de soya y gluten de trigo en *C. undecimalis*. Asimismo, se ha observado que *C. ensiformis* presenta GH menores a otras harinas vegetales (Cuenca *et al.* 2013), esto puede deberse a que esta especie contenga mayor cantidad de FAN que las especies analizadas por este autor, los cuales inhiben el crecimiento de los peces (Moyano *et al.* 1998; Alarcón *et al.* 2001; Francis *et al.* 2001; Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002; Pérez *et al.* 2003; Oña *et al.* 2005), al disminuir la biodisponibilidad de los nutrientes mediante la inhibición de la actividad enzimática. De Oña *et al.* (2003), mencionan que las diferencias en los valores de hidrólisis entre las distintas proteínas, podrían estar relacionadas a sus perfiles aminoacídicos y a las características de sus estructuras terciarias.

Tabla 2. Actividad de enzimas proteolíticas del estómago (proteasas ácidas) e intestino (proteasas alcalinas) de *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758.

Actividad Proteolítica	Unidades ml ⁻¹	Unidades g Tejido fresco ⁻¹	Unidades juveniles ⁻¹
Ácida	52.78±5.38	263.9±26.91	2111.2±215.27
Alcalina	380.02±15.26	1900.1±76.28	1215.67±48.80

Se incluye la desviación estándar.

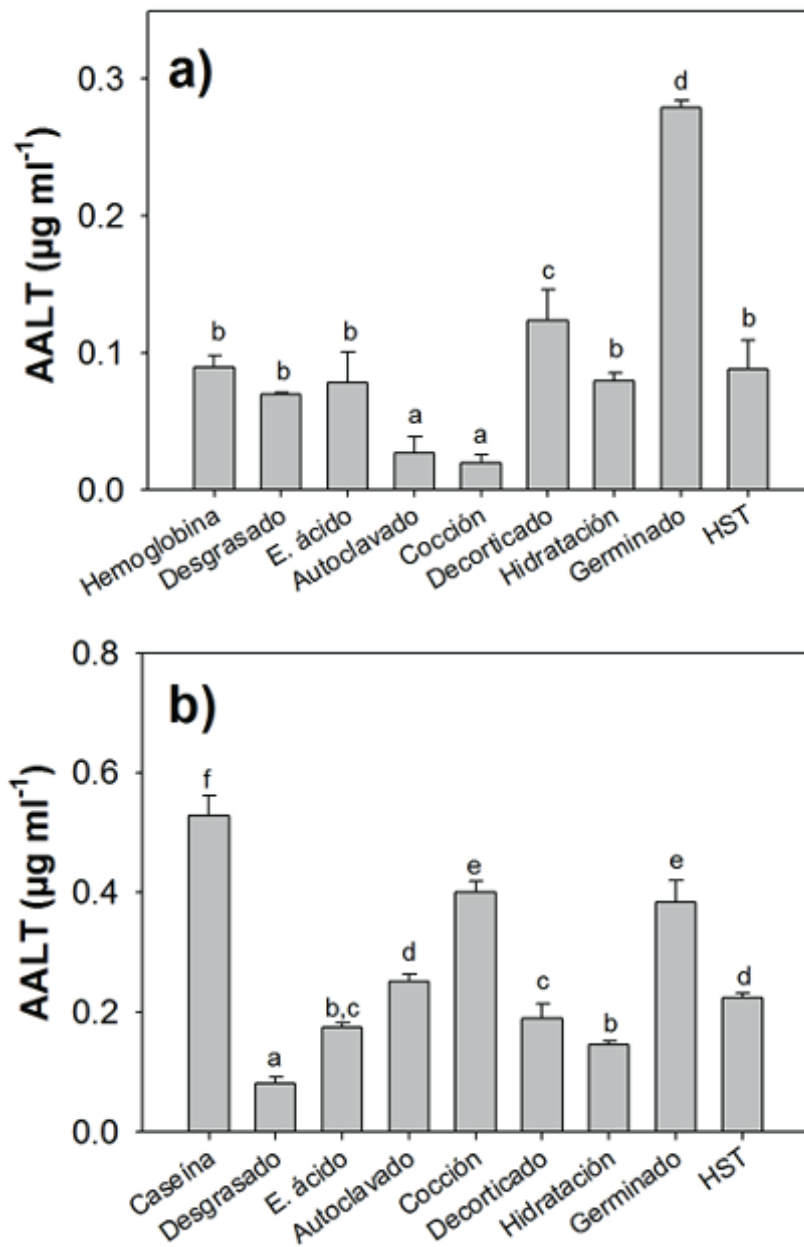


Figura 2. Valores de AALT ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DE}$) de los ingredientes proteínicos de las harinas de *Cannavalia ensiformis*: a) fase ácida, como ingrediente de referencia la hemoglobina y b) fase alcalina, como ingrediente de referencia la caseína.

Tabla 3. Valores finales de los grados de hidrólisis (GH) fase ácida, fase alcalina, GH total y digestibilidad relativa (%) de los ingredientes proteínicos de las harinas de Cannavalia ensiformis, L. DC. e ingrediente de referencia (hemoglobina y caseína).

Ingrediente	GH Ácido	GH Alcalino	GH Total	Digestibilidad (%)
Harina Desgrasado	0.29 ± 0.06	2.97 ± 0.25	3.26	28.11
Harina E. ácido	0.21 ± 0.05	1.23 ± 0.07	1.44	12.40
Harina Autoclavado	0.39 ± 0.03	2.84 ± 0.12	3.23	27.89
Harina Cocción	0.76 ± 0.01	6.04 ± 0.37	6.80	58.73
Harina Decorticado	0.29 ± 0.04	2.00 ± 0.18	2.29	19.74
Harina Hidratación	0.25 ± 0.02	2.08 ± 0.05	2.33	20.10
Harina Germinado	0.35 ± 0.04	1.55 ± 0.11	1.90	16.43
Harina sin Tratamiento	0.45 ± 0.03	1.29 ± 0.20	1.74	15.05
Hemoglobina/Caseína	1.05 ± 0.02	10.53 ± 0.24	11.58	100.00

Se incluye el % y la desviación estándar.

En el análisis de AALT, en la fase ácida, los mejores valores se obtuvieron en los tratamientos de germinado y decorticado, mientras que en la fase alcalina fue el tratamiento por cocción, seguido del germinado con respecto a los demás tratamientos. En este sentido, se considera que las enzimas intestinales tienen una mayor actividad proteolítica que las enzimas gástricas para *O. niloticus*, lo cual es normal si consideramos que la tilapia no posee un estómago bien desarrollado (Pérez-Muñoz & Sáenz-Ramos, 2015), datos similares reportaron Chong *et al.* (2002) en el cíclido azul (*Symphysodon aequifasciata, Pellegrin,*

1904), lo anterior se vio reflejado en el proceso de hidrólisis de los diferentes tratamientos de *C. ensiformis*, debido a que la fase alcalina mostró valores mayores de hidrólisis que los presentados por la fase ácida del estómago, indicando que en el estómago de *O. niloticus* se lleva a cabo la iniciación de la hidrólisis proteica pero que es en el intestino donde ocurre la mayor parte de la degradación y por ende una mayor cantidad de aminoácidos libres que son absorbidos al torrente sanguíneo por los enterocitos de las paredes intestinales (Moyano *et al.* 1998; Concha-Frías, 2008).

Tabla 4. Valores finales de la liberación de aminoácidos totales (AALT) fase ácida de los ingredientes proteínicos de harinas de Cannavalia ensiformis, L. DC. e ingrediente de referencia (hemoglobina).

Ingrediente	AALT (µg ml ⁻¹)	AALT (%)
Hemoglobina	0.09 ± 0.009	100.00
Harina Desgrasado	0.07 ± 0.001	77.70
Harina E. ácido	0.08 ± 0.023	86.99
Harina Autoclavado	0.03 ± 0.012	30.11
Harina Cocción	0.02 ± 0.006	21.93
Harina Decorticado	0.12 ± 0.022	138.29
Harina Hidratación	0.08 ± 0.006	88.48
Harina Germinado	0.28 ± 0.006	311.15
Harina sin Tratamiento	0.09 ± 0.021	98.14

Se incluye el % y la desviación estándar.

Tabla 5. Valores finales de la liberación de aminoácidos totales (AALT) fase alcalina de los ingredientes proteínicos de harinas de Cannavalia ensiformis, L. DC. e ingrediente de referencia (caseína).

Ingrediente	AALT (µg ml ⁻¹)	AALT (%)
Caseína	0.53 ± 0.03	100.00
Harina Desgrasado	0.08 ± 0.01	15.45
Harina E. ácido	0.17 ± 0.01	32.98
Harina Autoclavado	0.25 ± 0.01	47.48
Harina Cocción	0.40 ± 0.02	75.85
Harina Decorticado	0.19 ± 0.02	35.94
Harina Hidratación	0.15 ± 0.01	27.68
Harina Germinado	0.38 ± 0.04	72.57
Harina sin Tratamiento	0.23 ± 0.01	42.56

Se incluye el % y la desviación estándar.

La harina con mayor digestibilidad *in vitro* y valores de AALT en fase alcalina fue la harina cocida de *C. ensiformis* con respecto al resto de harinas. En este aspecto, los estudios realizados indican que las proteasas alcalinas durante el proceso de hidrólisis proteínica en *O. niloticus* son las que llevan a cabo la mayor cantidad de hidrólisis y apoya que el intestino es el órgano donde se absorbe la mayor cantidad de aminoácidos liberados en el proceso. Por su parte, los valores GH y AALT para la harina de cocido, nos indican que es posible realizar una sustitución parcial de pasta de soya por *C. ensiformis* en dietas para *O. niloticus*.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a la Organización de Estados Americanos (OEA), por el apoyo mediante la beca otorgada durante la realización de esta investigación, y a Patricia Hinojosa por su apoyo técnico en el procesamiento de la *Canavalia*, así como al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), donde se me permitió realizar mi estancia de investigación. 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.

REFERENCIAS

- 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 and P. Kestemont (eds.). Abstracts of the International Conference - *Aquaculture Europe '98. European Aquaculture Society, Special Publication* No. 26. Oostende, Belgium. pp. 2-3.
- AGUILERA, G. C., R. MENDOZA, G., MÁRQUEZ & I. IRACHETA. 2005. Alligator gar (*Atractosteus spatula*) larval development and early conditioning to artificial diets. In: *Memories of Aquaculture America New Orleans, Louisiana, E.U.A.* pp 6.
- 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, University of Ibadan, Nigeria.
- ALARCÓN, F. J., F. L. GARCÍA-CARREÑO & M. A. N. DEL TORO. 2001. Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 179-18. DOI: 10.1023/A:1014079919461
- ALARCÓN, F. J., F. J. MOYANO & M. DÍAZ. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-STAT system. *Journal of the Science of food and Agriculture* 82: 697-704. DOI: 10.1002/jfsa.1100
- ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis Doctoral. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México. 180 p.
- ANDUAGA-COTA, R., A. G. COTA-GASTÉLUM, M. R. FALCÓN-VILLA, G. YÁNEZ-FARIAS & 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, Sonora.
- ANSON, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*. 22, 79-89. DOI: 10.1085/jgp.22.1.79
- AOAC INTERNATIONAL. 1990. Official Method of Analysis. 15th Ed. *Association of Official Analytical Chemists*. Washington, D.C. 1094 pp.
- AUDU, S. S. & M. O. AREMU. 2011. Effect of processing on chemical composition of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Pakistan Journal of Nutrition* 10 (11): 1069-1075.
- ÁVALOS-SÁNCHEZ, A. M. 2006. *Digestibilidad in vitro* de dietas con diferentes combinaciones de gigantes diseñadas para larvas y juveniles de pescado blanco del lago de Patzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan, 1879). Tesis de Licenciatura, U.M.S.N.H., Facultad de Biología, Morelia Michoacán, México. 52 pp.
- BAUTISTA, G. A. 2009. Obtención de subproductos a base de semilla de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) sometidos a diferentes procesos tecnológicos con potencial aplicación en alimentos para acuicultura. Tesis de Licenciatura. Tecnológico de estudios superiores de Huixquilucan, La Paz, Baja California Sur, México.
- CHONG, A., R. HASHIM & A. BIN ALI. 2002. Inhibition of protease activities in *Discus Symphysodon spp.* By three plant meals. *Aquaculture International* 10: 433-441.
- CHURCH, F. C., H. E. SWAISGOOD, D. H. PORTER & G. CATIGNANI. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66: 1219-1227.
- CONCHA-FRÍAS, B. 2008. Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias del Mar, UCN, Coquimbo, Chile.
- CUENCA-SORIA, C. A., C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, J. L. ORTIZ-GALINDO, R. GUERRERO-ZARATE, M. A. PERERA-GARCÍA, R. E., HERNÁNDEZ-GÓMEZ & H. NOLASCO-SORIA. 2013. Digestibilidad *in vitro* de ingredientes proteínicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Revista Universidad y Ciencia* 29 (3): 263-275.
- DIMES, L. E. & N. F. HAARD. 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 108A (2-3): 349-362.
- 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.
- FAO. 2012. Grassland species index. *Canavalia ensiformis*.
- FRANCIS, G., H. P. S. MAKKAR & K. BECKER. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199 (3-4): 197-227.

- FRÍAS-QUINTANA, C. A., C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ & G. MÁRQUEZ-COUTRIER. 2010. Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill 1863). *Universidad y Ciencia* 26(2): 265-282.
- KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal General Physiology* 30: 291-310.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A., R. GALVÁN-CRUZ, M. A. OLVERA-NOVOA & C. CHÁVEZ-MARTÍNEZ. 1988. The use of jack bean (*Cannavalia ensiformis* Leguminosae) meal as a partial substitute for fish in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Cichlidae). *Aquaculture* 68: 165-175.
- MOYANO, F. J., F. J. ALARCÓN & M. DÍAZ. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of *in vitro* digestibility assays. *Comparative Biochemistry and Physiology* 5: 135-143.
- MOYANO, F. J., M. A. SAÉNZ DE RODRIGÁNEZ, M. DÍAZ & A. G. J. TACON. 2014. Application of *in vitro* digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture* 6:1-20. DOI:10.11/raq.12065
- 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 lisstenocarpa* Seeds from Southern Kaduna, Northwest Nigeria. *ISRN nutrition*.
- 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. *Aquaculture Reports* 3: 214-219.
- OÑA C., F. J. ALARCÓN, M. DÍAZ & E. ABELLÁN. 2003. Estudio comparativo de la degradación *in vitro* de proteínas por las proteasas estomacales de Denton (*Dentex dentex*), Pargo (*Pagrus Pagrus*) y el híbrido Dentex x Pagrus. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA): 540-549.
- OÑA, C., F. J. ALARCÓN, M. DÍAZ & E. ABELLÁN. 2005. Efecto de los inhibidores presentes en harinas vegetales sobre las proteasas intestinales de dos espáridos y su híbrido. X Congreso Nacional de Acuicultura, Almería España.
- OSUIGWE, D. I., A. I. OBIKEZIE & 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 in Kassel Witzzenhause.
- PÉREZ-MUÑOZ, M. M. & M. S. SAÉNZ-RAMOS. 2015. Crecimiento de las tilapias *Oreochromis niloticus* en cultivo Monosexual y ambos sexos, en sistemas de producción semi-intensivos. Tesis para optar el título de Ingeniero Acuicola. Universidad Autónoma de Nicaragua. Nicaragua.
- 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 bonaerensis*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA): 442-453.
- RIVAS, V. M. 2006. Valor nutricional del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L.Walp) para camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.
- SANDOVAL-CASTRO, C. A. & F. HERRERA-GÓMEZ. 2001. Cambios en la población de protozoarios ruminales por efecto de la inclusión de *Canavalia ensiformis* a la dieta de bovinos. Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. 12:166-171.
- 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 Nutrition* 103: 530-535.
- TACON, A. G. J. 1995. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *Journal of Applied Ichthyology* 11: 205-214.
- 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.
- 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.
- WALTER, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, Edited by H.J. Bergmeyer. Verlag Chemie. Weinham pp 270-277.
- WYSS, U. & H. BICJEL. 1988. Ripe beans of *Canavalia ensiformis* (jackbean) as feed ingredient for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology* 20: 325- 326.