

**DEPOSICIÓN DE PROTEÍNA Y ENERGÍA EN TILAPIAS
(*Oreochromis spp.*) ALIMENTADAS CON DIETAS SUB-ÓPTIMAS
EN PROTEÍNA Y SUPLEMENTADAS CON ÁCIDO GLUTÁMICO,
ALFACETOGLUTÁRICO O SUCCÍNICO**

por

María del Carmen Rojas Hernández

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

INDUSTRIA PECUARIA

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2011**

Aprobada por:

Edgardo Ojeda Serrano, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Ernesto O. Riquelme, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Saúl Wiscovich Teruel, M. S.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

Pedro Vásquez Urbano, Ph. D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

José R. Latorre, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Four experimental diets were formulated in order to determine their effect on weight gain, fat, protein and energy retention, and body composition of tilapias (*Oreochromis spp.*). The control diet was formulated to contain 27 % crude protein and the three remaining diets contained 20 % crude protein and were supplemented with 5 % of either L-glutamic, alphaketoglutaric or succinic acids, respectively. The results show that there were no significant differences in weight gain, protein and fat deposition, retained energy and body composition of the tilapias. Even though there were no significant differences, the group of tilapias that received the diet supplemented with 5 % succinic acid showed values that were closer to those of the control group. The results suggest that a 20 % crude protein diet supplemented with 5 % succinic acid seems like a feasible alternative for feeding tilapias, depending on the commercial cost of the additive.

RESUMEN

Cuatro dietas experimentales fueron formuladas con el propósito de evaluar sus efectos sobre la ganancia en peso, retención de grasa, proteína y energía y composición química corporal de tilapias (*Oreochromis spp*). Una dieta control o testigo fue formulada con 27 % de proteína y las tres dietas restantes contuvieron 20 % de proteína y suplementadas con 5 % de L- glutámico, alfacetoglutámico o ácido succínico, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron que no hubo diferencias significativas sobre la ganancia en peso, proteína y grasa acumulada, energía retenida y composición corporal de las tilapias. A pesar de no haber efectos significativos, las tilapias suplementadas con ácido succínico presentaron los valores más cercanos a los de la tilapias alimentadas con la dieta testigo. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que una dieta formulada con 20 % de proteína y suplementadas con 5 % de ácido succínico puede ser una buena alternativa para la alimentación de tilapias, dependiendo del costo del suplemento comercial.

DEDICATORIA

Este trabajo representa la culminación de un sueño que, al principio, se creía difícil de realizar. Por este motivo, quiero empezar dedicando este grandioso proyecto a:

- Dios, por realizar todos mis sueños y por colocar en mi camino a personas buenas que me ayuda y me motivan a luchar y a poner todo mi esfuerzo, entrega y empeño para alcanzar mis metas
- Mi mamá, mujer valiente y luchadora, quién logró una de las metas más difíciles de alcanzar para una madre: lograr que sus hijos tengan una buena profesión y sean felices con las cosas que han logrado. Mami, gracias por enseñarme las cosas verdaderamente importantes en la vida.
- Mis tías, tíos y primos (Piojito, Yesenia, Lolita, Yari, Javier) y a mi hermano. Gracias por estar siempre pendiente de mi y mis necesidades. Los Quiero Mucho.
- Grisely de Jesús Gómez y Javier Pérez Lafont (profesores de la UPR en Utuado) por ayudarme a encontrar mi verdadera vocación y por motivarme a luchar hasta alcanzar mis metas.
- Carmen Medina (consejera académica del Colegio de Ciencias Agrícolas) quién dirigió mis pasos para hacer la maestría en acuicultura.
- Aixa Rivera, por siempre tratarnos como una madre y siempre estar dispuesta a consolarnos, aconsejarnos y a darnos ánimos en los momentos de mayor frustración. Te Quiero Mucho.

- Mis Super Mega Queridos Amigos: Nancy Ortíz, Jessica Torres, Adamaris Lamourt, Javier Jiménez, Verónica Acevedo, Mayra González, Héctor L. Rodríguez, Katherine Domenech, Gerardo Rivera, Samuel Prieto, Deborah Vélez y Viviana Rivera, por ser parte de este gran proyecto, ayudarme en las tareas que el experimento requería y, sobre todo, por consolarme y animarme en los momentos de angustia. Los Quiero Mucho.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que directa e indirectamente fueron parte de este proyecto y aportaron con sus conocimientos y entera disposición para que este sueño se realizara. Le agradezco enormemente a:

- Mi comité de tesis compuesto por Profesor Saúl Wiscovich, Dr. Ernesto Riquelme y Dr. Edgardo Ojeda por todos sus conocimientos y apoyo brindado.
- Dr. José R. Latorre por permitirme y autorizarme a hacer mi maestría en acuicultura y por todo el apoyo brindado.
- Las asistente administrativas del Departamento de Industria Pecuaria (Jackeline, Sonia, Ireliz) por todo su apoyo y, sobre todo, por siempre recibirme con una sonrisa.
- Hiram y Miguel, por enseñarme que siempre hay una manera más fácil de hacer las cosas
- María del Rocío Suárez, por su comprensión, disposición y por materiales provistos. Gracias!!!! Sin ti varios estudiantes no lo habiéramos logrado. Fuiste un ángel en nuestro camino. Te quiero mucho.
- Dr. Guillermo Ortíz, por sus consejos y materiales provistos.
- Sr. Aneudy Badillo, por su gran disposición en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

Abstract	ii
Resumen	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	vi
Tabla de Contenido	vii
Lista de Tablas	viii
Lista de Figuras	ix
Introducción	1
Objetivos	3
Revisión de Literatura	4
Materiales y Métodos	15
Localización	15
Animales Experimentales	15
Dietas Experimentales	16
Variables de Respuesta	18
Análisis Estadístico	20
Resultados y Discusión	21
Conclusiones	28
Bibliografía	29

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Composición de las dietas experimentales (base seca)	17
Tabla 2	Ganancia de peso de los peces en los distintos tratamientos experimentales	22
Tabla 3	Ecuaciones de regresión que predicen el crecimiento (peso acumulado) de las tilapias en los distintos tratamientos, a través del período experimental	24
Tabla 4	Composición corporal inicial y final de los peces en los distintos tratamientos experimentales	25
Tabla 5	Balance de proteína, grasa y energía de los peces en los distintos tratamientos	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema general de la partición de la energía de los alimentos proporcionados a peces de agua dulce (adaptado de NRC, 1993)	7
Figura 2	Representación esquemática de los puntos de incorporación de las cadenas carbonadas de los aminoácidos a intermediarios del Ciclo de Krebs	9
Figura 3	Peso acumulado de los peces a través del período de alimentación, según tratamientos	24

INTRODUCCIÓN

En países de bajo ingreso económico y con déficit de alimentos para la población humana, el consumo de carne de pescado aporta el 18.5 % del total de la proteína animal en la dieta, según datos estadísticos recopilados por la Organización para la Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAO, 2009). De acuerdo a la información suministrada por esta misma agencia, la acuicultura aporta el 76 % de la producción mundial de peces de agua dulce para consumo humano (27.8 millones de toneladas, con un valor cercano a los treinta mil millones de dólares estadounidenses) y el suministro *per cápita* de productos acuícolas, que alcanzó 7.8 kg en el año 2006, ha experimentado una tasa de crecimiento anual de 6.9 %. De hecho, se espera que, en corto tiempo, la acuicultura supere a la pesca de captura como fuente de carne de pescado para la alimentación humana.

La tilapia es uno de los peces de agua dulce más importantes en acuicultura (Fitzsimmons *et al.*, 2006). Ésta se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Mair *et al.*, 1997; Beardmore *et al.*, 2001) y constituye el tercer grupo mas importante de peces de agua dulce cultivados para consumo humano (El Sayed, 1999). Su producción excede dos millones de toneladas métricas al año y, por su importancia en la acuicultura y su buen desempeño productivo, es conocida como el “pollo acuático” (Nguyen, 2008).

Entre sus características de producción se destacan su rápido crecimiento, adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, resistencia a enfermedades,

habilidad para crecer y reproducirse en cautiverio (Nguyen, 2008), tolerancia a una amplia variación en la calidad del agua y de regímenes nutricionales (Mair *et al.*, 1997; Beardmore *et al.*, 2001) y su capacidad de adaptación a sistemas de policultivo junto a otros peces como la carpa común (*Cyprinus carpus*; Frei *et al.*, 2006) y otras especies acuícolas como el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*; Yuan *et al.*, 2009).

La tilapia es el principal pez de agua dulce que se cultiva en Puerto Rico (principalmente las especies: *Tilapia mossambica*, *T. aurea*, *T. nilotica*, *T. rendalli*, *T. zilli* y *T. hibrida*) pero la producción local no es suficiente para cubrir la demanda del público consumidor que se satisface a través de importaciones (principalmente de Asia). Esta situación indica que existe amplio espacio en el ámbito local para aumentar la producción.

La industria acuícola en Puerto Rico enfrenta una serie de problemas que han limitado su desarrollo. Uno de ellos, y quizás el de mayor importancia, es el elevado costo del alimento, que incide significativamente en el costo de producción. Las dietas típicas para tilapia contienen una cantidad elevada de proteína (desde 27 a más de 45 %). La harina de pescado ha sido la fuente de proteína más utilizada en dietas para peces (El Sayed, 1999; Zhou *et al.*, 2004; Lunger *et al.*, 2007) debido a su excelente balance de aminoácidos, pero su costo actual hace prohibitiva su incorporación a dietas prácticas. Por esto, es imperativo investigar la necesidad real de proteína (o aminoácidos) de estos peces o la posibilidad de utilizar substitutos que no afecten su desempeño productivo.

OBJETIVOS

La presente investigación se realizó con el objetivo general de determinar la tasa de crecimiento de tilapias alimentadas con dietas sub-óptimas en proteína (según las recomendaciones del NRC, 1993) y suplementadas con cetoácidos o ácidos dicarboxílicos de bajo peso molecular. Además, determinar el efecto de esta suplementación sobre la retención de proteína y energía corporal en los peces sometidos a los distintos regímenes alimenticios.

Los objetivos de esta investigación responden a la hipótesis de que las tilapias no requieren realmente la cantidad de proteína dietética que se ha sugerido (27 a más de 40 %) y que esta recomendación está basada en el hecho de que las tilapias derivan una gran parte de la energía requerida para llevar a cabo sus funciones metabólicas a partir del catabolismo de aminoácidos. En consecuencia, se postula que es posible disminuir la proteína dietética al adicionar moléculas orgánicas semejantes a los aminoácidos (cetoácidos o ácidos dicarboxílicos de bajo peso molecular) sin afectar su crecimiento ni la deposición de proteína o energía corporal.

A nuestro entender, hasta al presente no se ha investigado esta posibilidad y, de ser correcta, representa una alternativa para disminuir la proteína dietética y, por ser éste el nutriente de mayor costo en las dietas, eventualmente permitiría disminuir los costos de alimentación si se se llegan a conseguir estos suplementos con una pureza denominada grado alimenticio.

REVISIÓN DE LITERATURA

Datos publicados por la FAO (2009) indican que el 47% de la producción de pescado comercializada para el consumo humano durante el año 2006 provino de producciones acuícolas, especialmente en Asia. Esto representa una drástica merma en las capturas marinas, mientras que la producción de animales acuáticos en estanques de tierra o en sistemas de recirculación ha aumentado significativamente.

En acuicultura, la alimentación representa más del 50 % de los costos operacionales, siendo las fuentes de proteína los ingredientes más costosos en la dieta (El Sayed, 1999). Las dietas para peces de agua dulce se caracterizan por un alto contenido de proteína total, muy superior al contenido de proteína de dietas para especies terrestres (NRC, 1993). Estas recomendaciones se han obtenido a partir de investigaciones que utilizan la metodología de la mejor respuesta en crecimiento al proporcionar dietas con distinto contenido de proteína y, es posible, que las recomendaciones estén sobreestimadas ya que esta metodología no permite estimar la proporción de aminoácidos que son destinados a satisfacer las necesidades de energía.

Al igual que en animales terrestres, se ha demostrado un requerimiento absoluto de 10 aminoácidos, denominados dietéticamente indispensables que son: arginina (ARG), histidina (HIS), isoleucina (ILE), leucina (LEU), lisina (LYS), metionina (MET), fenilalanina (PHE), treonina (THR), triptófano (TRP) y valina (VAL) (Nelson y Cox; 2000a). Otros aminoácidos como alanina (ALA), ácido

aspártico (ASP), cisteína (CYS), ácido glutámico (GLU), glicina (GLY), prolina (PRO), serina (SER) y tirosina (TYR) se consideran no indispensables ya que pueden ser sintetizados por el animal, a partir de cetoácidos y otros aminoácidos (Nelson y Cox; 2000a). Dada la capacidad de los organismos para sintetizar estos aminoácidos a partir de otros precursores, como los cetoácidos, la inclusión de estos compuestos en las dietas podría representar una alternativa viable para disminuir la cantidad de proteína de origen animal que se recomienda en la nutrición de especies acuáticas.

La formulación de alimentos para la acuicultura ha estado tradicionalmente basada en harina de pescado como la principal fuente de proteína de origen animal, por su alto contenido proteínico y buen balance de aminoácidos indispensables, además de ser excelente fuente de ácidos grasos esenciales, energía digerible, minerales y vitaminas (El Sayed, 1999; Zhou *et al.*, 2004; Lunger *et al.*, 2007). Sin embargo, la escasez global de harina de pescado junto al aumento en la demanda y competencia de este producto por parte de otras industrias, tales como la ganadera y la avicultura, ha ocasionado un marcado incremento en su precio. Este aumento en los costos ha resultado en una reducción en la viabilidad económica de las industrias acuícolas que dependen de este ingrediente para la alimentación, sobre todo en los países en desarrollo (El Sayed, 1999).

Por estas razones, resulta necesario identificar fuentes alternas de proteína que sean viables y estén disponibles localmente para el reemplazo de la harina de

pescado (El Sayed, 1999). Entre las fuentes alternas disponibles se incluyen: sub productos de las pesquerías, de la crianza de animales terrestres y del cultivo de cereales, además de plantas oleaginosas y acuáticas y semillas de leguminosas (El Sayed, 1999). Sin embargo, la proteína de origen vegetal y proveniente de subproductos de origen animal no ha sido efectiva para reemplazar totalmente la harina de pescado, debido a la presencia de factores antinutricionales, tales como el gossipol en la semilla de algodón, inhibidores de tripsina en la soya (El Sayed, 1999) y mimosina en la planta de *Leucaena* (Lim y Dominy, 1991).

Además, algunas proteínas de origen vegetal y animal presentan deficiencias de ciertos aminoácidos indispensables para la nutrición de peces como son la leucina (en subproductos avícolas), isoleucina (en harina de sangre); metionina y cisteína (en la harina de soya y en la semilla de algodón) y que limitan la utilización de estos productos como reemplazo total de la harina de pescado (El Sayed, 1999).

Desde el punto de vista de requerimientos energéticos, se estima que los costos energéticos de mantenimiento de los peces son menores a los de las especies terrestres, debido a un menor gasto de energía relacionada con termoregulación y con la excreción de los productos finales del metabolismo nitrogenado (amoníaco) que reduce la energía requerida para la síntesis de urea o ácido úrico (NRC, 1993). Además, se reconoce que los productos gaseosos de la digestión en peces es un valor mínimo, por lo que normalmente se ignora. Por

tanto, el valor energético de una dieta puede ser más alto cuando se proporciona a peces que a animales terrestres.

En la Figura 1 se muestra el esquema general de la partición de la energía de los alimentos proporcionados a peces, indicándose las pérdidas energéticas provenientes de la materia orgánica excretada en heces, orina y a través de las agallas, así como las pérdidas relacionadas con la producción de calor asociado a los procesos de digestión, absorción, metabolismo de los nutrientes absorbidos, metabolismo basal y actividad voluntaria.

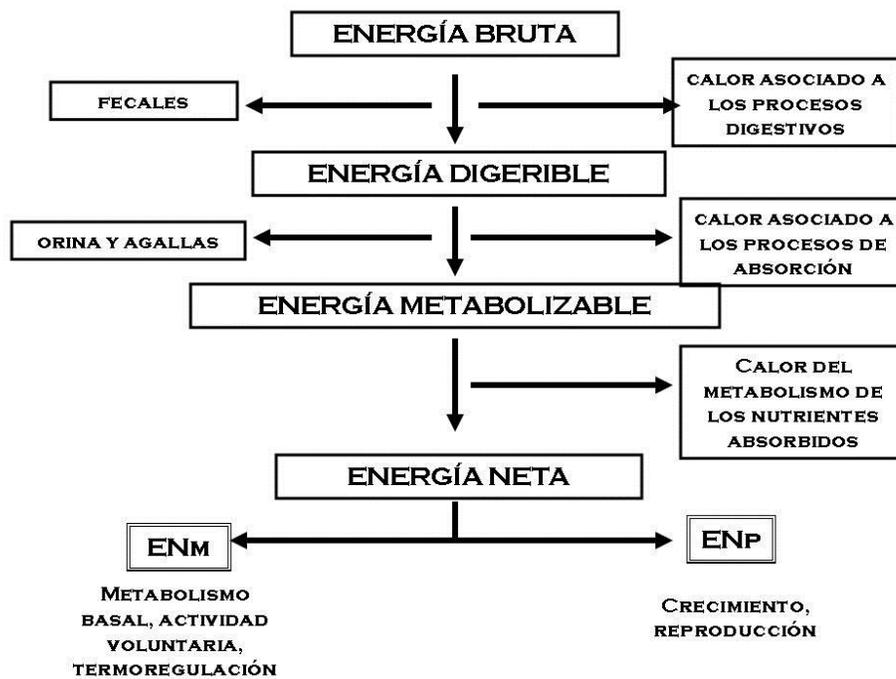


Figura 1. Esquema general de la partición de la energía de los alimentos proporcionados a peces de agua dulce (adaptado de NRC, 1993).

La principal fuente de energía en dietas para animales terrestres proviene de carbohidratos, por ser la fuente más abundante y de menor costo por unidad (Mcal) de energía. Dependiendo del tipo de peces (omnívoros, carnívoros), la capacidad para digerir los carbohidratos no estructurales (almidón, amilopectina) puede ser relativamente baja (50 % en trucha, carnívoro) o medianamente alta (70 % en tilapia, omnívoro) (Popma, 1982). Sin embargo, los métodos modernos de procesamiento de alimentos que involucran calor (peletizado de diámetro pequeño, extrusión), gelatinizan el almidón y aumentan su digestibilidad en la mayoría de las especies.

Tanto las proteínas como los lípidos son fuentes de energía altamente disponibles para los peces (Popma, 1982). Sin embargo, desde el punto de vista práctico, el uso de proteínas como fuente de energía es sumamente costoso para el productor y los lípidos son ingredientes escasos, costosos y difíciles de incorporar a las dietas.

Cuando los aminoácidos se utilizan como fuente de energía, tienen que ser desaminados (o transaminados) y las cadenas carbonadas sufren transformaciones hasta dar compuestos que se integran al ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs) y son oxidados. En la Figura 2 se presenta, en forma esquemática, los sitios, en el ciclo de Krebs, donde se incorporan las cadenas carbonadas resultantes de la oxidación de los distintos aminoácidos.

El primer paso en el catabolismo de la mayoría de los aminoácidos, una vez que llegan al hígado, es la transaminación (Nelson y Cox; 2000 a). Este

proceso implica la remoción de los grupos alfa aminos de los aminoácidos por acción de enzimas conocidas como aminotransferasas (Nelson y Cox, 2000a; Tanous *et al*; 2005) y la transferencia de estos grupos a un alfa cetoácido, que actúa como aceptor de grupos aminos (Ur- Rehman y Fox, 2001). El principal cetoácido que interviene como aceptor de grupos aminos es el alfacetoglutarico (Yvonn *et al*, 1998; Tanous *et al.*, 2005), dando origen a ácido glutámico, un amino ácido que participa en el proceso de gluconeogénesis, en la excreción de amonio y en la síntesis de otros aminoácidos (Nelson y Cox, 2000a).

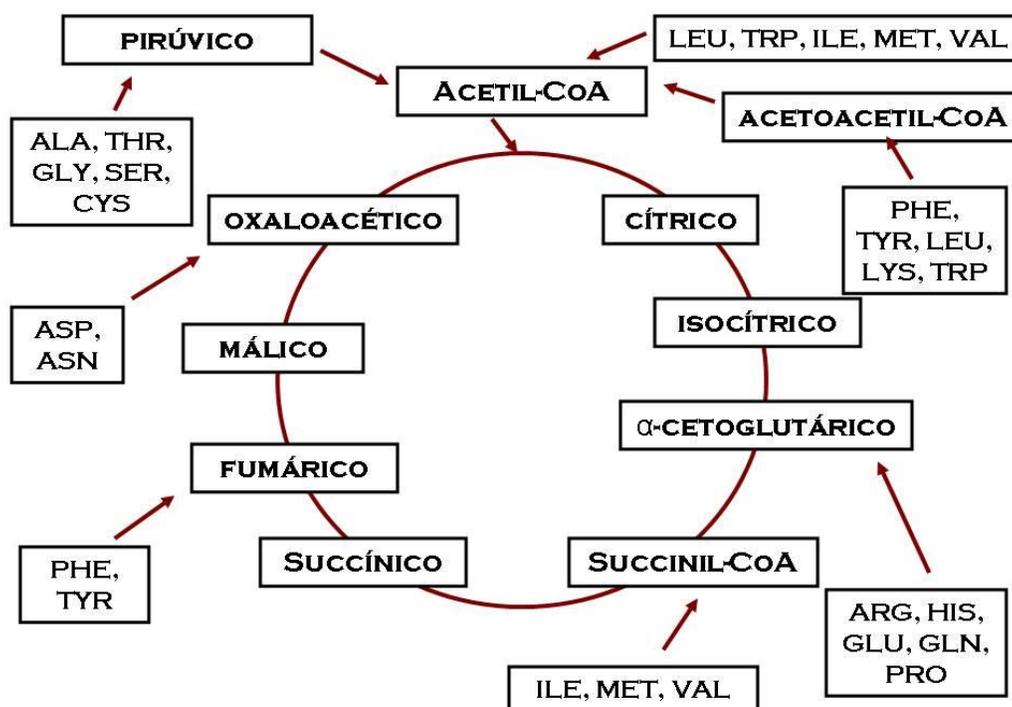


Figura 2. Representación esquemática de los puntos de incorporación de las cadenas carbonadas de los aminoácidos a intermediarios del Ciclo de Krebs.

Amoníaco es el principal producto final del metabolismo de nitrógeno en peces osteites, agnatos, y condriictios de agua dulce y proviene del catabolismo (oxidación) de proteínas y amino ácidos obtenidos en la dieta (Evans, 1993). Por consiguiente, la producción de amoníaco aumenta significativamente después de la ingestión de alimentos (Brett y Zala, 1975; Brown y Cameron, 1991) debido a que a los peces se les proporcionan dietas con elevado contenido de proteína y absorben un exceso de aminoácidos que no se almacenan y deben ser desaminados. Las cadenas carbonadas son oxidadas en el ciclo de Krebs o utilizadas en la síntesis de otros componentes corporales, como lípidos y carbohidratos (Evans, 1993). Más del 50% del nitrógeno proveniente de la dieta es utilizado por el organismo de los peces para crecimiento y producción de energía (Atherton y Aitken, 1970; Beamish y Thomas, 1984). Se ha encontrado que, con una dieta deficiente en lípidos, gran parte de la proteína es metabolizada para energía o desaminada para la conversión a grasas y carbohidratos, contribuyendo a la excreción de amoníaco y reduciendo la cantidad de nitrógeno retenido dentro de las células (Atherton y Aitken, 1970).

Existen varios procesos catabólicos que aumentan la producción de amoníaco, siendo una de ellas la transaminación de amino ácidos (Walton y Cowey, 1977), donde varias aminotransferasas transfieren el grupo amino de los amino ácidos a alfa cetoglutarato para formar glutamato, el cual es desaminado por la enzima glutamato deshidrogenasa (Evans, 1993). Este proceso ocurre en muchos tejidos de los peces, entre ellos: músculos, branquias, riñones y el

hígado, siendo este último el órgano de mayor actividad enzimática (Evans, 1993; Randall y Ip, 2006)). Van den Thillart y van Raaij (1995) encontraron que en *Carrasius aurata*, el 50 a 70 por ciento del amoniaco se produce en el hígado. El amoniaco es producido en el citosol de la células hepáticas por desaminasas o por transaminacion mediado por aminotransferasas localizadas en el citosol y por glutamato deshidrogenasa (Ballantyne, 2001).

La segunda manera es a través de la hidrólisis de los grupos amidos en glutamina y asparagina, catalizada por las glutaminasa y asparaginasa, respectivamente (Evans, 1993). Estas enzimas realizan su actividad en el hígado, riñones y branquias. Levi et.al (1974) e Iwata (1989) encontraron que la enzima glutamina sintetasa captura amoniaco cuando los niveles internos de éste compuesto se elevan. Dicha protección es benéfica para el cerebro. Estudios realizados en carpas por Pequin y Serfaty (1966) indican que una de las funciones de glutamina es transportar nitrógeno en la corriente sanguínea entre los tejidos proteolíticos y desaminantes.

El ciclo de las purinas y pirimidinas también involucra desaminización, contribuyendo a la producción de amoniaco. De los tres mecanismos anteriormente mencionados, este último es energéticamente más caro (Evans, 1993). En este proceso el grupo amino de glutamato es transferido a oxaloacetato mediante aspartato aminotransferasa para formar aspartato y regenerar alfa cetoglutarato (Evans, 1993). Aspartato reacciona con monofosfato de inosina (IMP) y con trifosfato de guanosa (GTP) para formar adenilosuccinato, mediado

por adenilsuccinato sintetasa, seguido por la formación de fumarato y monofosfato de adenosina (AMP), mediado por adenilosuccinato liasa (Evans, 1993). La desaminización de AMP y AMP deaminasa libera amoníaco y regenera IMP completando el ciclo (Evans, 1993). La mayor actividad enzimática para la desaminación de amino ácidos ocurre en los tejidos musculares (Evans, 1993). Casi toda la producción de amoníaco es debida a la desaminación de adenilatos, mediada por AMP desaminasa (Evans, 1993). También algunos amino ácidos individuales, tales como, histidina, serina y treonina, pueden experimentar desaminación catalizada por enzimas específicas (Van Waarde, 1983).

Amoníaco, oxígeno y dióxido de carbono son los tres gases envueltos en el proceso de respiración de los peces (Randall y Ip, 2006). La mayoría de los peces obtienen oxígeno del agua y expulsan dióxido de carbono y amoníaco los cuales son transportados desde la sangre a las branquias para su descarte al ambiente acuático (Randall y Ip, 2006). De los tres gases respiratorios, el amoníaco es el más tóxico (Randall y Ip, 2006) y, en altas concentraciones en las células corporales, es perjudicial para los peces llegando a producirles la muerte. Aproximadamente un 40 a 50 por ciento del nitrógeno obtenido de la dieta es expulsado como amoníaco dentro de 24 horas (Lim *et al.*, 2004; Ip *et al.*, 2004c), lo que es indicativo de una alta utilización de aminoácidos como fuente de energía celular..

De acuerdo a lo discutido en los párrafos anteriores, las alternativas para disminuir los costos de alimentación en la crianza de tilapias, hasta la fecha, se

han enfocado en substituir la harina de pescado por otras fuentes de proteína, especialmente aquellas de alta disponibilidad local, con escaso éxito. Sin embargo, existe otra alternativa, que no ha sido evaluada y que se relaciona con la posibilidad de incluir ingredientes, o suplementos, que sean utilizables como fuente de energía en reemplazo de la oxidación de aminoácidos para este propósito, como sería el empleo de ciertos cetoácidos y ácidos dicarboxílicos de bajo peso molecular que intervienen directamente en las vías bioquímicas intracelulares relacionadas con el metabolismo de energía.

En el metabolismo intracelular, algunos cetoácidos pueden ser oxidados para la generación de energía (ATP), convertidos en grasa y almacenados en el tejido adiposo del organismo para ser utilizados como fuente de energía cuando sea necesario. En adición, el organismo puede utilizar los cetoácidos para formar glucosa y llevar a cabo reacciones necesarias dentro de la fisiología celular.

El principal cetoácido que favorece la síntesis de aminoácidos en el organismo es el alfacetoglutarico (Yvon *et al.* 1998; Nelson y Cox, 2000b). Este ácido ($C_5H_6O_5$) es producido mediante la descarboxilación oxidativa del ácido isocítrico, que es uno de los intermediarios en el ciclo del ácido cítrico o Ciclo de Krebs. Entre sus funciones se encuentra aceptar grupos amino para dar origen a un aminoácido (ácido glutámico) que interviene en la síntesis de otros aminoácidos no indispensables (prolina, arginina, guanina, glutamina e histidina). También se considera como glucogénico ya que interviene en la fase preparativa del proceso de gluconeogénesis llevado a cabo en las células hepáticas (Nelson y

Cox, 2000a,b; Matzi *et al.*, 2007) y es el precursor de succinil-CoA, que también participa en la síntesis de varios aminoácidos no indispensables (Nelson y Cox; 2000a).

En adición, Matzi *et al.* (2007) reportaron que otras de las funciones del ácido alfaetoglutárico son mejorar la morfología y funciones intestinales y ejercer acciones anabólicas en el organismo.

Los ácidos di- y tri-carboxílicos son de suma importancia para el metabolismo celular (Srisawang *et al.*, 2006). El ácido succínico es un ácido dicarboxílico, cuya fórmula química es $C_4H_6O_4$ y se origina de la descarboxilación oxidativa de succinil-CoA en el ciclo del ácido cítrico. El ácido succínico es oxidado bajo condiciones aeróbicas resultando en la liberación de electrones que se incorporan al proceso de fosforilación oxidativa en el cual se genera energía en forma de ATP (Cox *et al.*, 2005). Por tanto, el ácido succínico es un compuesto de suma importancia en la generación de energía para el metabolismo celular y para llevar a cabo funciones de crecimiento, reproducción y mantenimiento en el organismo de diversas especies, incluyendo los peces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Acuicultura de la Finca Laboratorio Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, ubicada en las coordenadas 18° 13.16' N, 67° 8.85' W a 30 msnm; temperatura promedio diaria de 25.5 °C y 1771 mm de precipitación anual.

Animales experimentales

Se utilizaron 160 peces de distintas variedades de *Oreochromis spp.* (6.37 ± 0.3 g de peso) procedentes de la Finca Valle Llano, localizada en Lajas, Puerto Rico. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en ocho peceras de vidrio de 76 litros de capacidad, localizadas linealmente sobre una mesa del laboratorio de acuicultura y equipadas con un biofiltro (Δ ZOO; 120 L/hr) para su oxigenación y remoción de desechos suspendidos en el agua.

Los desechos depositados en el fondo de las peceras (excretas y alimento no consumido) se removieron mediante la técnica de succión. Las peceras fueron cubiertas con una cortina de sarán para limitar el crecimiento de fitoplancton debido a la radiación solar. Semanalmente se evaluó la calidad de agua de cada

pecera midiendo la temperatura, el pH y la concentración de nitrito y amonio. La concentración de nitrito y amonio se determinó utilizando un “Freshwater Quality Kit” (LMAQ2).

Los peces se pesaron al inicio del experimento y luego semanalmente durante un periodo de diez semanas, utilizando una balanza digital (Avery Weigh-Tronix; 3608).

Dietas Experimentales

Se formularon cuatro dietas experimentales (Tabla 1). La dieta testigo (**TEST**) se formuló siguiendo las recomendaciones nutricionales para *Oreochromis spp.* sugeridas por el NRC (1993). Las tres dietas restantes se formularon reduciendo el contenido de proteína bruta de 27.5 a 20.8 % (aproximadamente en un 25 %) y adicionando 5 % de ácido glutámico (**GLU**), ácido alfa-cetoglutarico (**AKG**) o ácido succínico (**SUCC**) como fuentes de carbono para el metabolismo energético.

Los ingredientes utilizados en cada dieta fueron mezclados manualmente adicionando agua para facilitar la operación. La mezcla húmeda fue peletizada mediante un molino manual para carne, utilizando un disco con orificios de 3 mm de diámetro. Posteriormente, las dietas peletizadas se secaron en un horno de convección (Shel Lab, 1370 FM) a una temperatura de 75 °C hasta peso constante (AOAC, 1995). Una vez secos, los pellets fueron parcialmente triturados

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales (base seca)

Concepto	<i>Dietas Experimentales</i>			
	TEST	GLU	AKG	SUCC
Ingredientes (%)				
Harina de soya	40.00	21.60	21.60	21.60
Harina de gluten de maiz	24.00	25.00	25.00	25.00
Maíz molido	16.10	22.50	22.50	22.50
Afrecho de trigo	13.50	19.00	19.00	19.00
Aceite vegetal	2.50	3.00	3.00	3.00
Fosfato dicalcico	2.50	2.50	2.50	2.50
Premezcla Vit-Min ^a	1.00	1.00	1.00	1.00
Sal	0.40	0.40	0.40	0.40
Ácido alfacetoglutárico	0.00	0.00	5.00	0.00
Ácido glutámico	0.00	5.00	0.00	0.00
Acido succínico	0.00	0.00	0.00	5.00
Composición Proximal				
Materia seca, %	89.96	90.43	90.43	90.43
Proteína bruta, %	27.48	20.78	20.78	20.78
Extracto etéreo, %	4.65	5.42	5.42	5.42
Energía Metabolizable, Mcal/kg	2.64	2.59	2.59	2.59
Fibra Bruta, %	5.82	5.40	5.40	5.40
Fósforo, %	0.88	0.82	0.82	0.82
Calcio, %	0.75	0.72	0.72	0.72
Lisina, %	1.41	0.96	0.96	0.96
Treonina, %	1.04	0.77	0.77	0.77
Metionina, %	0.40	0.31	0.31	0.31
Triptófano, %	0.33	0.24	0.24	0.24
Costo de las dietas^b, US \$ kg⁻¹	0.37	0.28	0.28	0.28

^a La premezcla vitamínica-mineral provuyó (por kg de alimento): vitamina A, 8000 UI, Vitamina D₃, 600 UI, Vitamina E, 60 mg, Vitamina K, 0.8 mg, tiamina, 15.0 mg riboflavina, 18 mg, piridoxamina, 30 mg, cobalamina, 0.25 mg, ácido pantoténico, colina, 400 mg; niacina, 200 mg; ácido fólico, 4.0 mg; biotina, 0.8 mg; Vitamina C, 600 mg; Fe, 180 mg; t, Mn, 25 mg; Zn, 110 mg; Cu, 5.0 mg; I, 1.5 mg; Se, 0.52 mg.

^b El costo de las dietas AKG, GLU y SUCC no incluye el costo de los ácidos adicionales, ya que se utilizaron ácidos grado reactivo, que son de alto costo.

para facilitar el consumo por parte de los peces. La trituration se realizó utilizando un molino manual de granos y los alimentos triturados fueron almacenados en bolsas plásticas resellables.

Variables de respuesta

Los efectos de tratamientos se midieron en términos de ganancia de peso (GP, g d⁻¹), ganancia específica de peso (GEP, %) y retención de proteína (g), grasa (g) y energía corporal (kcal).

La ganancia de peso se obtuvo mediante análisis de regresión lineal simple de acuerdo con el modelo (Steel y Torrie, 1980):

$$P = \alpha + \beta t_i$$

donde:

- P = Peso acumulado durante los 70 días de experimentación, g
- α = Intercepto con el eje de las ordenadas (Y), estimador del peso promedio inicial de los peces (g)
- β = Coeficiente de regresión lineal, estimador de la tasa de crecimiento (g d⁻¹)
- t_i = Peso promedio de los peces de cada acuario en el *i*ésimo día de pesaje (i = 170)

La ganancia específica de peso (GEP), muy utilizada en investigaciones con peces, se calculó según la fórmula (Brown, 1957; citado por Solomon *et al.*, 2007):

$$\text{GEP} = [(\text{Ln PF} - \text{Ln PI})/T] \times 100$$

donde:

Ln PF = Logaritmo natural del peso promedio final de los peces en cada pecera, según tratamiento

Ln PI = Logaritmo natural del peso promedio inicial de los peces en cada pecera, según tratamiento

T = Tiempo de experimentación (70 días)

La retención de proteína y grasa se obtuvo siguiendo la técnica del sacrificio comparativo de animales, comparando el contenido promedio de proteína y grasa de los peces al inicio y al final del período experimental.

Para determinar el contenido de proteína y grasa corporal de los peces, se sacrificaron 4 peces por tratamiento (registrando su peso previo ayuno de 24 horas) utilizando la técnica de hipotermia, colocando dos 2 peces de cada pecera en bolsas resellables individuales, que fueron sumergidas en agua con hielo por espacio de una hora.

Los peces fueron triturados con una batidora de inmersión (Hamilton Beach Commercial; HMI 200) y homogeneizados con un homogenizador (Polytron, PT 1600 E) hasta formar una pasta. Se tomaron muestras de cada homogeneizado y se secaron en un horno de convección a 65 °C por 36 horas. Las muestras secas fueron trituradas manualmente en un mortero y se obtuvieron submuestras para determinar el contenido de proteína bruta y cenizas (AOAC, 1995). El contenido de grasa se calculó por diferencia (materia seca – proteína bruta – cenizas), bajo el supuesto de que los animales no acumulan carbohidratos.

La energía retenida se calculó a partir de la proteína y grasa acumulada por los peces durante el período de experimentación, utilizando el valor de 5.24 kcal g⁻¹ para proteína y 9.17 kcal g⁻¹ para grasa (Ogunji *et al.*, 2008).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza usando el procedimiento GLM del programa estadístico SAS versión 9.2 (SAS, 2009). Para todas las variables se calcularon los estadísticos descriptivos (varianzas y desviaciones estándar), y se verificaron los supuestos de normalidad. El nivel de significancia escogido fue $P = 0.05$, donde P es la probabilidad donde el valor de la F calculada (razón entre el cuadrado medio de tratamientos y el cuadrado medio del error, o residual) fuese mayor que el de la F tabulada (Steel y Torrie, 1980). De haber efectos significativos ($P < 0.05$) las medias de tratamientos fueron comparadas entre sí utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, según (Steel y Torrie, 1980):

$$W = q_a (p, f_e) s_y$$

Donde:

W ; valor crítico de las diferencias entre las medias para que sean declaradas significativamente diferentes.

q_a = valor numérico tabulado equivalente a la diferencia entre la media de mayor valor (Y_{max}) y la media de valor (Y_{min}) dividido entre los errores estándar de las medias (s_y)

p : número de las medias involucradas en la comparación (equivale al número de tratamientos)

f_e : grados de libertad del término del error

s_y : error estándar de las medias, equivalente a la raíz cuadrada de la razón entre el cuadrado medio del error y el número de observaciones utilizadas para calcular cada media

El diseño experimental utilizado en la investigación fue un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y dos repeticiones por tratamiento. Se consideró a cada pecera como una unidad experimental.

El modelo estadístico utilizado fue (Steel y Torrie, 1980):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variables de respuesta

μ = Media general

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento o dieta experimental ($i = 1, \dots, 4$)

ε_{ij} = Error experimental con media = 0 y varianza = σ^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el transcurso de la investigación, la calidad del agua de las peceras se evaluó periódicamente y se encontró que el pH se mantuvo entre 6.5 y 8.5; estos resultados se aproximan a los datos reportados por El- Sherif y El- Fleky (2009), donde indican que las tilapias obtienen mejor ganancia de peso a un pH entre 7 y 8. La temperatura fue casi constante ($25.0 - 25,2 \text{ }^\circ \text{C}$) y la concentración de nitrito ($0.05 \text{ a } 0.30 \text{ mg l}^{-1}$) y de amonio ($0.0 \text{ a } 0.25 \text{ mg l}^{-1}$) se mantuvo a niveles que no afectan el crecimiento o desarrollo de los peces. Cabe destacar que no se registraron muertes de peces en ninguno de los tratamientos.

En la Tabla 2 se presentan los promedios de ganancia diaria y la ganancia específica de peso de los peces en los distintos tratamientos a través de los 70 días de experimentación.

No se observaron diferencias significativas en ganancia de peso ni ganancia específica de peso entre los peces sometidos a los distintos tratamientos dietéticos, pero, en general, los peces alimentados con las dietas subóptimas en proteína tendieron a exhibir una tasa de crecimiento inferior (40 – 50 %) a la de los peces alimentados con la dieta testigo.

Es probable que la disminución en la cantidad de proteína provista en las dietas haya sido parcialmente responsable de esta disminución pero, ya que las necesidades reales de nutrientes son unidades de masa (g d^{-1}) o energía (Mcal d^{-1}) y no de porcentajes, como se expresa tradicionalmente, es más probable que

el menor crecimiento observado en los grupos **GLU**, **AKG** y **SUCC** se deba a un menor consumo de alimento total.

La acumulación de masa corporal en animales es el resultado del consumo de nutrientes en exceso a las necesidades de mantenimiento (NRC, 1993). En este experimento, se proveyó alimento a razón del 5 % del peso vivo de los animales (ajustado semanalmente) que se considera una cantidad mayor a la capacidad de consumo real de los peces, por lo que la provisión de alimento no se considera una limitante para la menor ganancia de peso observada.

Sin embargo, aunque no fue posible determinar el consumo real de alimento bajo las condiciones experimentales, se observó, al limpiar las peceras, que hubo menos residuos de alimento en las peceras del grupo testigo que en el resto, y que los peces alimentados con la dieta **AKG** fueron los que dejaron una mayor cantidad de residuo, quizás debido a un problema de aceptabilidad por parte de los peces.

Tabla 2. Promedios de ganancia de peso y ganancia específica de peso de los peces en los distintos tratamientos experimentales

Concepto	Tratamientos				P > F
	TEST	GLU	AKG	SUCC	
Peso promedio inicial, g	6.020	6.460	6.020	6.80	0.54
Peso promedio final, g	21.375	15.800	13.650	16.56	0.11
Ganancia total de peso, g	15.355	9.340	7.630	9.760	0.14
Ganancia diaria, g d ⁻¹	0.216	0.133	0.109	0.139	0.14
Ganancia específica, %	1.756	1.279	1.703	1.271	0.17

Las ganancias de peso que mostraron las tilapias son similares a otras reportadas en la literatura por Winfree y Stickney (1981) con dietas que contenían entre 32 y 56 % de proteína y las observadas por Solomon et al. (2007) con dietas que contenían 24.1 a 25.8. % de proteína, y por El-Sherif y El-Feky (2009) en los peces que fueron mantenidos en peceras en que el pH del agua fue de 7 u 8, comparables con los de esta investigación.

El crecimiento de las tilapias durante el período experimental fue relativamente constante, como se muestra en la Figura 3, con pequeñas fluctuaciones semanales que es un comportamiento típico del crecimiento de los animales.

Tradicionalmente la tasa de crecimiento se obtiene por diferencia entre el peso final obtenido menos el peso inicial, dividido entre el periodo de tiempo transcurrido entre pesadas. Esta manera calcular las ganancias promedio de peso no toma en cuenta las fluctuaciones típicas del crecimiento a través del tiempo, por lo que se considera que un análisis de regresión, con peso acumulado como variable dependiente y tiempo transcurrido como variable independiente, es una mejor metodología para hacerlo y que el coeficiente de regresión que se obtiene es un mejor estimador de la ganancia de peso.

La tasa de crecimiento exhibida por los peces utilizados en este experimento puede ser descrita por las ecuaciones de regresión que se indican en la Tabla 3. Las tasas de crecimiento obtenidas con esta metodología fueron 0.219, 0.127, 0.096 y 0.122 para los peces en los grupos **TEST**, **GLU**, **AKG** y **SUCC**, respectivamente. Se puede observar que estas tasas de crecimiento

difieren levemente de las obtenidas por el método de la simple diferencia, por las razones mencionadas anteriormente.

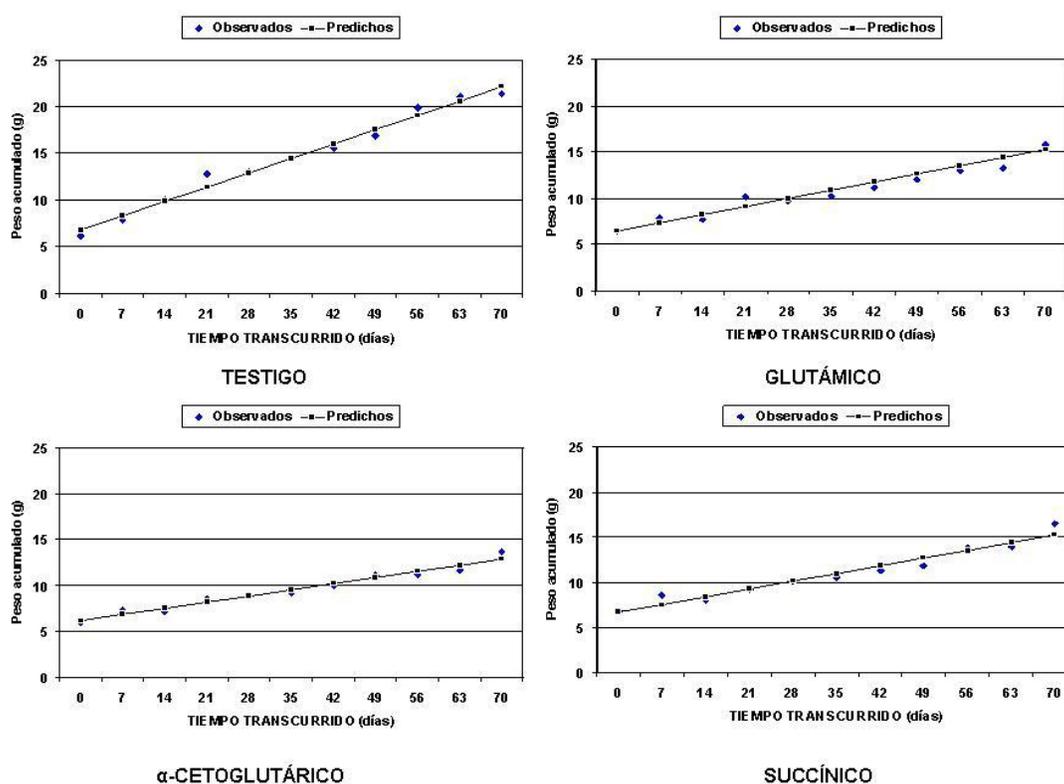


Figura 3. Peso acumulado de los peces a través del período de alimentación, según tratamientos.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión que predicen el crecimiento (peso acumulado) de las tilapias en los distintos tratamientos, a través del período experimental.

Tratamiento	Ecuación de predicción	R ²
Testigo	$P = 6.806 + 0.219 t$	0.88
GLU	$P = 6.409 + 0.127 t$	0.92

AKG	$P = 6.179 + 0.096 t$	0.95
SUCC	$P = 6.700 + 0.122 t$	0.88

P = Peso acumulado (g); t = Tiempo transcurrido (días)

La magnitud de los coeficientes de determinación (0.88 a 0.95) indica un buen ajuste entre los valores observados y los valores predichos.

En la Tabla 4 se presentan los promedios de composición corporal de las tilapias al inicio y al final del período experimental. Contrario a lo que se esperaba, al término del experimento no hubo diferencias en el contenido de humedad (P = 0.80), cenizas (P = 0.91), proteína (P = 0.10) o grasa corporal (P = 0.51) en los peces sometidos a los distintos tratamientos alimenticios. Sin embargo, se observó una tendencia a que el contenido de grasa corporal final fuera mayor en los peces en los tratamientos **AKG** y **SUCC**.

Tabla 4. Composición corporal inicial y final de los peces en los distintos tratamientos experimentales.

Componente (%)	Composición Inicial	Composición final según tratamientos			
		TEST	GLU	AKG	SUCC
Humedad	74.40	72.38	72.27	73.22	72.03
Cenizas	3.89	4.30	4.46	4.15	4.30
Proteína	14.79	16.30	15.57	13.81	15.01
Grasa	6.91	7.01	7.70	8.81	8.65

Solomon *et al.* (2007), en una investigación en la que se compararon diversos ingredientes energéticos (maíz, sorgo, arroz y trigo) en dietas con 25 %

de proteína para tilapias, encontraron que la composición corporal de los peces, después de ocho semanas de alimentación, no experimentó cambios significativos, promediando 73.08 % de humedad, 4.83 % de cenizas, 15.81 % de proteína y 5.83 % de grasa, valores similares a los obtenidos en esta investigación.

Considerando estos datos de composición corporal junto con los datos de ganancia de peso, se puede inferir que pudo suscitarse un desbalance proteína/energía en los peces al disminuir la proteína dietética y proporcionar aditivos que se consideran fuente de energía. Este desbalance puede ser la causa de las ligeras diferencias en la deposición de proteína y grasa corporal ya que una mayor disponibilidad de energía fomenta la deposición de tejido adiposo.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de acumulación de proteína, grasa y energía de los peces experimentales durante los 70 días de alimentación. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variables de respuesta consideradas. Sin embargo, se observaron diferencias numéricas notables ($P=0.07$) en la deposición de proteína entre los animales suplementados con ácido glutámico y ácido succínico en comparación con los peces que recibieron la dieta testigo. Esta diferencia fue aún mayor en los peces que recibieron ácido alfa-cetoglutarico como suplemento.

La deposición de tejido adiposo fue menos variable, indicando que algún tipo de desbalance proteína/energía afecta más la deposición de tejido muscular (proteína) que las reservas energéticas. Dabrowski y Guderley (2002) indicaron que, a pesar de que los peces tienen un menor metabolismo basal que los

animales terrestres, el costo energético de la síntesis de proteína es significativamente mayor y que la oxidación de la proteína absorbida es la fuente de energía más importante. Añaden que no se conoce realmente la contribución de la oxidación de los aminoácidos individuales para este efecto y tampoco están claros los mecanismos de control de estas oxidaciones.

Tabla 5. Balance de proteína, grasa y energía de los peces en los distintos tratamientos.

Concepto	Tratamientos				P > F
	TEST	GLU	AKG	SUCC	
Peso promedio, g	13.79	11.13	9.84	11.68	0.09
Peso metabólico (PM), kg	0.029	0.025	0.023	0.026	0.09
Proteína acumulada, g	2.57	1.50	0.99	1.48	0.07
Proteína acumulada, g (kg PM) ⁻¹	88.62	60.00	43.04	65.48	0.07
Grasa acumulada, g	1.07	0.77	0.79	0.96	0.38
Grasa acumulada, g/ (kg PM) ⁻¹	35.78	30.80	34.35	42.47	0.37
Energía acumulada:					
En proteína, Kcal	13.45	7.88	5.20	7.76	0.07
En grasa, Kcal	9.82	7.05	7.21	8.84	0.38
Total, Mcal	23.28	14.94	12.42	16.60	0.15
Energía acumulada, Mcal (kg PM) ⁻¹	0.78	0.59	0.54	0.61	0.26

Aunque la metodología utilizada en este estudio no permitió realizar un análisis de costos, es pertinente indicar que el costo de la dieta testigo (Tabla 1) fue de US \$ 0.37 kg⁻¹, que es menor al costo de las dietas comerciales disponibles en el mercado (US \$ 0.45 a 0.60 kg⁻¹, dependiendo del fabricante) lo

que se atribuye a que no se utilizó harina de pescado. El costo de las dietas experimentales, sin incluir el costo de los suplementos, fue de US \$ 0.28 kg⁻¹, que permite inferir que serían económicamente viables si el costo de los suplementos (50 g kg⁻¹) no excede US \$ 0.05 (considerando la menor ganancia de peso), lo que equivaldría a un precio de US \$ 1.00 kg⁻¹ de suplemento.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir lo siguiente:

- Con el fin de bajar los costos de alimentación, es posible disminuir la proteína dietética tradicionalmente recomendada y excluir la harina de pescado en la formulación, sin afectar significativamente los indicadores de desempeño productivo, si se adicionan fuentes alternas de energía como lo son algunos cetoácidos o ácidos dicarboxílicos
- Al implementar esta práctica, se hace necesario reevaluar los requisitos netos de los aminoácidos indispensables para evitar una merma en el crecimiento de los peces (deposición de proteína muscular)
- También se hace necesario reevaluar la relación proteína/energía en las dietas, para evitar cambios en la composición corporal de los peces, que incide en la conversión alimenticia y costos de producción
- De los suplementos evaluados, el ácido succínico aparenta ser el de mayor valor como suplemento energético, efecto atribuible a una mejor aceptación por los peces y, por consiguiente, un mayor consumo de alimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Atherton, W. D. and Aitken, A. 1970. Growth, nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri*. Rich. Comp. Biochem. Physiol. 36: 719.
- A. O. A. C. 1995. Official Methods of Analyses. Assoc. Off. Anal. Chemists. Washington, D. C.
- Ballantyne, J.S. 2001, Amino acid metabolism. In: P.A. Wright and P.M. Anderson, Editors, Fish Physiology, Nitrogen Excretion Vol. 20, New Academic Press, New York pp. 77–107
- Beamish, F. W. H. and Thomas, E. 1984. Effects of dietary protein and lipid on nitrogen losses in rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). Aquaculture: 41: 359.
- Beardmore, J. A., G. C. Mair, R. I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. Aquaculture. 197: 283–301.
- Breet, J. R. and Zala, C. A. 1975. Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. J. Fish. Res. Board. Can. 32: 2479.
- Brown, M. E. 1957. Experimental studies on growth. The Physiology of Fishes. Vol. 1. Academic Press, London. Pp 360-400
- Brown, C. R. and Cameron, J. N. 1991. The induction of specific dynamic action in channel catfish by infusion of essential amino acids. Physiol. Zool. 64: 276.
- Cox, S. J., S. S. Levanon, A. Sánche, H. Lin, B. Peercy, G. N. Bennett, and K-Y. San. 2006. Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: A succinate production case study. Metabolic Engineering. 8, Issue 1: 46-57.
- Dabrowski, K. and H. Gurdeley. 2002. Intermediary Metabolism. In: Halver, J. E. and R. W. Hardy (Eds.) Fish Nutrition. Elsevier, Amsterdam. Pp 309-365
- El-Sayed, A-F. M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. Aquaculture. 179:149-168.
- El-Sherif, M. S. and A. M. I. El-Feky. 2009. Performance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. 1. Effect of pH. Int. J. Agric. Biol. 11:297-300

- Evans, D. H. 1993. *The Physiology of Fishes.*:CRC Press. Salsbury Cove
- F.A.O. 2009. *Estado mundial de la pesca y la acuicultura.* 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura. FAO, Roma.
- Fitzsimmons, K. 2004. Development of new products and markets for the global tilapia trade, Proceedings of the 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Manila, Philippines, September 12–16 (2004), pp. 624–633.
- Frei, M., Razzak, M.A., Hossain, M.M., Oehme, M., Dewan, S., Becker, K. 2006. Performance of common carp, *Cyprinus carpio* L. and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L) in integrated rice-fish culture in Bangladesh. *Aquaculture*. 262: Issues 2-4: 250 – 259.
- Hansen, B. V., U. Houlberg, and Y. Ardö. 2001. Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal*.11, Issues 4-7: 225-233.
- Iwata, K. 1989. Nitrogen metabolism in the mudskipper, (*Periophthalmus cantonensis*): changes in free amino acids and related compounds of various tissues under conditions of ammonia loading with special reference to its high ammonia tolerance. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A: 351.
- Kaushik, S. J. and I. Seilliez. 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. Review article. *Aquaculture Research* 41:322-332
- Levi, G., Morisi, G., Coletti, A., and Catanzaro, R. 1974. Free amino acids in fish brain: normal levels and change upon exposure to high ammonia concentrations in vivo and upon incubation of brain slices. *Comp. Biochem. Physiol.* 49 A: 623.
- Lim, C., and W. G. Dominy. 1991. Utilization of plant proteins by warmwater fish. In: Akiyama, D.M., Tan, R.K.H. Eds., *Proc. Aquaculture Feed processing and nutrition workshop.* Thailand and Indonesia, 19–25. pp 163–172.
- Lim, C.K., Wong, W.P., Lee, S.L.M., Chew S.F. and Y.K. 2004, Ip, The ammonotelic African lungfish, (*Protopterus dolloi*), increases the rate of urea synthesis and becomes ureotelic after feeding, *J. Comp. Physiol.* B 174. pp. 555–564.

- Lunger, A. N., E. McLean, T. G. Gaylord, D. Kuhn, and S. R. Craig. 2007. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*. 271, Issue 1-4: 401-410.
- Mair, G. C., L. R. Dahilig, E. J. Morales, J. A. Beardmore, and D. O. F. Skibinski. 1997. Application of genetic techniques for the production of monosex male tilapia in aquaculture: Early experiences from the Philippines. *Proceedings of the Fourth Central America Symposium on Aquaculture, Tegucigalpa, Honduras, April 22-24*. 225-227.
- Matzi, V., J. Lindenmann, A. Muench, J. Greilberger, H. Juan, R. Wintersteiger, A. Maier, and F. M. Smolle-Juettner. 2007. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined α -ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *Eur J Cardiothorac Surgery*. 32: 776-782.
- National Research Council (NRC), 1993. *National Research Council (NRC), Nutrient Requirements of Fish*, National Academy Press, Washington, D.C. USA.
- Nelson D. L., and M. M. Cox. 2000a. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Amino Acid Oxidation and Production of Urea. Third Edition. W. H. Freeman and Company, New York: 623-655.
- Nelson D. L., and M. M. Cox. 2000b. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Biosynthesis of Amino acids, Nucleotides and Related Molecules. Third Edition. W. H. Freeman and Company, New York: 827-829.
- Nguyen, T. N. 2008. The utilization of soybean products in Tilapia feed. A Review. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 53-65.
- Ogunji, J., R. S. Toor, C. Shulz, and W. Kloas. 2008. Growth performance, nutrient utilization of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* fed house fly maggot meal (Magmeal) diets. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci*. 8 :141-147
- Pequin, L. and Serfaty, A. 1966. Acid glutamique et excretion azotée chez la carpe commune (*Cyprinus carpio L.*) *Comp. Biochem. Physiol.* 18: 141.
- Popma, T. J. 1982. *Digestibility of Selected Feedstuffs and Naturally Occurring Algae by Tilapia*. Ph. D. Dissertation. Auburn University. Auburn, Alabama, USA.

- Randall, D. J. and Ip, Y. K. 2006. Ammonia as a respiratory gas in water and air breathing fishes. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 154: 216 – 225.
- Riche, M., and D. Garling. 2003. Feeding tilapia in Intensive recirculating systems. North Central Regional Aquaculture Center. Fact Sheet Series No. 114.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS/STAT 9.2 Users Guide. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina.
- Solomon, S. G., L. O. Tihamiyu and U. J. Agaba. 2007. Effect of feeding different grain sources on the growth performance and body composition of tilapia (*Oreochromis nilotica*) fingerlings fed in outdoor hapas. *Pakistan J. Nutr.* 6:271-275
- Srisawang, P., A. Chatsudthipong, and V. Chatsudthipong. 2007. Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1768: 1378-1388.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. 2nd. Edition. McGraw Hill Book Company, New York.
- Tanous, C., A. Gori., L. Rijnen., E. Chambellon, and M. Yvon. 2005. Pathways for α -ketoglutarate formation by *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. The Fourth IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization and Technology. *International Dairy Journal*. 15, Issues 6-9: 759-770.
- Ur-Rehman, S., and P. F. Fox. 2007. Effect of added α -ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. *Food Chemistry*. 76, Issue 1: 21-26.
- Van den Thillart, G. and van Raaij, M. 1995. Endogenous fuels; noninvasive versus invasive. In: P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Editors, *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Metabolic Biochemistry Vol. 4*, Elsevier, Amsterdam. pp. 33–63.
- Van Waarde, A., van den Thillard, G., and Kesbeke, F. 1983. Anaerobic energy metabolism of the European eel, (*Anguilla anguilla L*). *J. Comp.Physiol.*149: 169.
- Walton, M.J. and Cowey, C.B. 1977. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). *J. Comp. Biochem. Physiol.*, 57 B: 143.

- Winfree, R. A. and R. R. Stickney. 1981. Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. J. Nutr. 111: 1001-1012
- Wood, C. (1993). Ammonia and Urea Metabolism and Excretion. In D. H. Evans, The Physiology of Fishes (pp. 379-416). Salsbury Cove: CRC Press.
- Yuan, D., Y. Yi, A. Yakupitiyage, K. Fitzimmons, and J. S. Diana. 2009. Effects of addition of red tilapia (*Oreochromis spp.*) at different densities and sizes on production, water quality and nutrient recovery of intensive culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in cement tanks. Aquaculture. 298, Issues 3-4: 226-238.
- Yvon, M., S. Berthelot. and J. C. Gripon. 1998. Adding α -Ketoglutarate to Semi-hard Cheese Curd Highly Enhances the Conversion of Amino acids to Aroma Compounds. International Dairy Journal. 8, Issues 10-11: 889-898. (Abstr.)
- Zhou, Q.C., B. P. Tan, K. S. Mai, and Y. J. Liu. 2004. Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture. 241: 441-451.