



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA ENZIMA FITASA SOBRE LAS PROTEÍNAS
VEGETALES CONTENIDAS EN DIETAS PARA LA
ENGORDA DE JUVENILES CULTIVADOS DE CAMARÓN
ROSADO DEL GOLFO DE MÉXICO
Farfantepenaeus duorarum (Burkenroad, 1939)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

DIANA AGUILERA RIVERA

Asesores:

MVZ Ángel García Hernández

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés



México D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Los valientes no son aquellos que van por la vida
mirando al suelo intentando no tropezar,
son aquellos que toman riesgos, se tropiezan,
se levantan y retoman su camino.

Victor Sierra

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi madre, quien me dio la vida y se sacrificó desde el primer día para sacarnos adelante a mi hermana y a mí, por darnos una carrera para ser mujeres de bien, dedicadas al trabajo, inculcándonos siempre el querer ser las mejores en lo que hacemos y no pensar en el precio, si no en el premio.

Que Dios te bendiga mami, te amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero dar gracias a Dios por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, ya que gracias a ello pude desenvolverme más como profesionista, aprender cosas totalmente nuevas, tanto a nivel personal como profesional, lo que me permitió crecer más como ser humano.

Gracias a mi madre por todo su apoyo moral y económico, sus consejos, por ser un ejemplo para mí de que no importan las distancias para lograr nuestras metas y por estar incondicionalmente conmigo, en las buenas y en las malas, a pesar de que físicamente nos encontrábamos lejos. A mi hermana, por ser un ejemplo para mí, demostrándome que la perseverancia es la clave para lograr nuestros objetivos. A mi papá por su apoyo a lo largo de mi carrera, a Honey y Tábata por ser mi inspiración para decidir estudiar esta hermosa carrera. A la familia Chimal por estar nuevamente en mi vida y especialmente a mi primo Carlos por apoyar a mi madre durante el tiempo que físicamente estuve ausente de casa.

A mis amigos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser y seguir siendo parte de mi vida a lo largo de esos cinco años, en especial a Erik, Chuy, Alicia, Paulina (Güera), Bruno y Lalo, gracias por todos esos momentos y por su amistad incondicional.

Al Departamento de Producción Animal: Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, a mi primer asesor, MVZ Ángel García Hernández por el apoyo y los ánimos recibidos a lo largo de la realización de mi Servicio Social y mi trabajo de Tesis en la UMDI-Sisal.

A la familia Sotomayor González, especialmente a la señora Aurora y Alicia por ayudarme a encontrar un lugar para llegar a Mérida, Yucatán.

A la familia Lozoya Fernández por haberme recibido en la hermosa Ciudad de Mérida, por haberme abierto las puertas de su casa y por todas las atenciones que me brindaron durante todo ese tiempo, haciéndome sentir parte de su familia.

A mi segundo asesor, la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés por darme la oportunidad de trabajar con ella durante la realización de mi Servicio Social y mi proyecto de Tesis, por su paciencia y dedicación, por enseñarme que debemos ser tenaces y no darnos por vencidos al primer intento, haciéndome ver que yo soy capaz de dar mucho más de lo que muchos se imaginan.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través del Programa de Becas (60824 CIENCIA BÁSICA) y financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Leticia Arena por permitirme realizar parte de mi Servicio Social en el Área de Biología Molecular y por estar pendiente de mis intereses como profesionista y de mi desempeño a lo largo de esta investigación.

Gracias a todas las personas que estuvieron conmigo a lo largo de mi trabajo de investigación: a la Dra. Martha Guerrero Olazarán de la UANL por proporcionar la fitasa microbiana (FTE II) usada para la realización de este experimento; a Celio Hernández por compartirme parte de sus conocimientos tanto para su trabajo de tesis como para el mío; a Oscar Santiago por ayudar en las colectas de heces y alimentación de los organismos utilizados para mi experimento como parte de su Servicio Social; a los técnicos del Laboratorio Central, Vianey Sosa y Ariadna Paredes por la paciencia y la ayuda que me dieran para la determinación de actividad enzimática; a Korynthia López por la aclaración de todas mis dudas y el apoyo que me brindó el tiempo que estuve en el laboratorio de Química para determinar concentración de fósforo y sobre todo porque al final, nos hicimos grandes amigos; a Mauricio Emerenciano por estar siempre pendiente de mi aprendizaje, su apoyo y sus asesorías, a Adriana Silva por compartirme sus conocimientos y ayudarme en la elaboración de mi escrito. También agradezco a Moy (Técnico del Área de Maduración), Gabriel Taboada (Técnico del Área de Nutrición), Manuel Valenzuela (Técnico del Área de Estanquería), al Dr. Pedro Gallardo, la Dra. Carmen Galindo y Dr. Carlos Rosas por la aclaración de dudas. A todo el personal de la UMDI- Sisal, en general, mil gracias.

A los miembros de mi jurado: MVZ Ángel García Hernández, MVZ Luis Andrés Castro Fuentes, MVZ María de la Luz Chavacán Ávila, Biol. María Elena Loeza Fuentes y M. en C. Jesús Manuel Cortés Sánchez.

A Clau y a Boso, por ser mis papás adoptivos y estar siempre atentos si algo me hacía falta, por compartir su mesa y comida conmigo y convertirme en un miembro más de su familia, por todos los momentos compartidos y la confianza que ambos me dieron. Me los llevo en el corazón.

A mis amigos sisaleños, en especial a “mijo” Celio, David, Gemma, Talhia, Gaby Gómez, Manuel, “mi hijo” José Luis, Caro, la manta Ana y Juani, a “El Pana”, a Jorge “el Chileno”, a Mel, Daniel y su niña Julietita, a Oscar, Natalia, Adri Brasil, Héctor, el “Tizi”, Taboada y Honorio, por brindarme su amistad, por los momentos de diversión y estudio y por estar conmigo en las buenas y en las malas, siendo un gran apoyo en mi vida. Gracias por hacerme sentir en casa cuando estuve lejos de mi hogar, siempre serán mi familia postiza.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Acuicultura a nivel mundial y nacional.....	3
Biología del camarón rosado del Golfo de México <i>Farfantepenaeus duorarum</i>	5
1. Taxonomía.....	5
2. Distribución geográfica y abundancia.....	6
3. Morfología.....	7
4. Comportamiento.....	7
5. Reproducción y ciclo de vida.....	8
6. Sistema digestivo.....	9
7. Digestión química.....	11
Las fuentes de proteína.....	12
Digestibilidad.....	15
Importancia de la enzima fitasa en dietas para camarón.....	17
El papel del fósforo en la alimentación.....	18
Estudio de la digestibilidad en alimentos para camarón.....	21
Estudio de enzimas digestivas.....	23
ANTECEDENTES.....	27
Usos y limitaciones de la proteína vegetal y sus factores anti-nutricionales.....	27

Beneficios y limitaciones del uso de la fitasa.....	28
Digestibilidad en camarones.....	31
Estudio sobre enzimas digestivas en camarón.....	33
JUSTIFICACIÓN.....	35
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVOS.....	36
1. Objetivo general.....	37
2. Objetivos particulares.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
1. Origen de los animales.....	38
2. Dispositivo experimental.....	39
3. Diseño experimental y dietas.....	40
4. Parámetros evaluados.....	43
4.1 Digestibilidad aparente de fósforo total.....	43
4.2 Digestibilidad aparente de materia seca.....	43
4.3 Digestibilidad aparente de proteína.....	44
4.4 Actividad enzimática.....	44
4.5 Variables físico-químicas.....	45
4.6 Crecimiento.....	46
4.7 Supervivencia.....	46
5. Análisis estadísticos.....	46
RESULTADOS.....	47
1. Coeficiente de digestibilidad aparente.....	47

2. Actividad enzimática.....	48
2.1 Actividad de la tripsina.....	48
2.2 Actividad de la quimotripsina.....	50
2.3 Actividad de proteasas totales.....	52
2.4 Actividad de la glucosidasa.....	54
2.5 Actividad de la α -amilasa.....	55
2.6 Actividad de la leucin amino-peptidasa.....	57
2.7 Actividad de la carboxipeptidasa B.....	58
3. Variables físico-químicas.....	61
4. Crecimiento y supervivencia.....	62
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS.....	74
ANEXOS.....	87
Anexo 1. Proceso de elaboración de las dietas.....	89
Anexo 2. Análisis Químico Proximal de las dietas experimentales.....	90
Anexo 3. Inclusión de fitasa en harina de soya y canola.....	93
Anexo 4. Horario de actividades para recolección de heces.....	94
Anexo 5. Recolección de heces.....	95
Anexo 6. Método de Cenizas Insolubles en Ácido (AIA).....	96
Anexo 7. Determinación de fósforo total en alimentos y heces.....	97
Anexo 8. Glosario.....	99

FIGURAS.....	101
CUADROS.....	103

ABREVIATURAS

DAPT: Digestibilidad Aparente de Fósforo Total

DAMS: Digestibilidad Aparente de Materia Seca

DAP: Digestibilidad Aparente de Proteína

CDC: Coeficiente Diario de Crecimiento

mm: milímetros

g: gramos

m: metros

P³⁺: Fósforo

Ca²⁺: Calcio

Zn²⁺: Zinc

Mg²⁺: Magnesio

Fe²⁺: Hierro

C⁴⁺: Carbono

H¹⁺: Hidrógeno

O²⁻: Oxígeno

N^{3+} : Nitrógeno

K^{1+} : Potasio

S^{6+} : Azufre

ATP: Adenosín-Tri-Fosfato

Cu^{2+} : Cobre

Mn^{2+} : Manganeseo

Mo^{6+} : Molibdeno

Co^{2+} : Cobalto

CDA: Coeficiente de Digestibilidad Aparente

U: Unidades

DAE: Digestibilidad Aparente de Energía

h: horas

l: litros

μ : micras

mL: mililitros

mg: miligramos

mM: milimolar

M: Molar

TCA: Ácido Tricloroacético

TRIS: Hidroximetil aminometano

NaCl: Cloruro de Sodio

ANOVA: Análisis de varianza

U/g: Unidades/gramo

CDAMS: Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Materia Seca

CDAPT: Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Fósforo Total

CDAP: Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Proteína

HCl: Ácido clorhídrico

μl: microlitros

nm: nanómetros

RESUMEN

AGUILERA RIVERA DIANA. Efecto de la enzima fitasa sobre las proteínas vegetales contenidas en dietas para la engorda de juveniles cultivados de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) bajo la dirección de: MVZ Ángel García Hernández y Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés.

Debido a las limitantes en el uso de harina de pescado como fuente de proteína, en los últimos años se ha buscado sustituir este ingrediente por fuentes de proteína vegetal. Al haber una baja disponibilidad de fósforo en dichas fuentes, se pueden utilizar enzimas exógenas (fitasa). Se evaluó el efecto de la fitasa sobre proteínas vegetales presentes en dietas para *Farfantepenaeus duorarum*. Dos enzimas diferentes fueron comparadas: una enzima comercial (Ronozyme® P5000) y una enzima microbiana (FTE II). Una dieta Control sin fitasa fue incluida para comparar el rendimiento de las dietas experimentales. Se usaron siete camarones por tina con tres réplicas por tratamiento con peso inicial promedio de 11.46 g, alimentados 5 veces/día durante 60 días.

Se evaluó la digestibilidad aparente de fósforo total, materia seca y proteína en alimento y heces y la actividad enzimática con respecto al factor dieta y estadio de muda; coeficiente diario de crecimiento y supervivencia. En digestibilidad aparente de fósforo total y proteína, la dieta con Ronozyme® P5000 y FTE II fueron significativas ($p < 0.05$) en comparación con la Control. En digestibilidad aparente de materia seca, la dieta con Ronozyme® P5000 presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en relación a los otros

tratamientos. En actividad enzimática los resultados no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) en los niveles de glucosidasa, α -amilasa y leucin amino-peptidasa. En relación a tripsina y quimotripsina, la dieta control presentó niveles significativamente mayores ($p<0.05$) que los demás tratamientos. Para las proteasas totales y carboxipeptidasa B, la dieta Control y Ronozyme[®] P5000 presentaron los mayores resultados ($p<0.05$). Finalmente, el CDC no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos. La supervivencia fue superior al 80%.

INTRODUCCIÓN

Acuicultura a nivel mundial y nacional

La acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, y a mayor ritmo que la población, con un incremento del suministro acuícola per cápita desde 0.7 kg en 1970 hasta 7.8 kg en 2008, lo que constituye un crecimiento medio anual del 6.6%. Se espera que supere a la pesca de captura como fuente de pescado comestible. Mientras que a comienzos de la década de 1950 la producción acuícola (a excepción de las plantas acuáticas) era inferior a un millón de toneladas anuales, en 2008 ascendió a 52.5 millones de toneladas. La acuicultura mundial está liderada en gran medida por la Región de Asia y el Pacífico, la cual aporta el 89% de la producción en cantidad y el 79% en valor, Este dominio se debe principalmente a la enorme producción de China, la cual representa el 62% de la producción mundial en términos de cantidad y el 51% del valor mundial. Los 10 principales países productores de organismos acuáticos en el 2008 fueron: China, Perú, Indonesia, Estados Unidos de Norteamérica, Japón, India, Chile, Federación de Rusia, Filipinas y Myanmar.¹

En México, entre Sonora, Sinaloa, Baja California Norte y Baja California Sur se obtuvo un 70.26% del volumen total de producción pesquera y acuícola nacional en el 2008. En ese mismo año, el valor de la producción pesquera nacional fue de \$16,957 millones de pesos. Sonora, Sinaloa, Veracruz, Baja California Sur, Tamaulipas, Baja California Norte, Campeche y Tabasco son las entidades federativas que concentraron las cuatro quintas partes del total del valor de producción pesquera nacional en 2008. Para ese mismo año, la

producción de camarón alcanzó un volumen total de 196,289 toneladas en peso vivo, de las cuales 66.33% fueron obtenidas de la actividad acuícola con un volumen de 130,201 toneladas, 22.55% de aguas marinas con 44,261 toneladas y 11.12% de esteros y bahías con 21,827 toneladas.²

El crecimiento vertiginoso de la población ha provocado que la explotación de muchas especies marinas haya alcanzado su rendimiento máximo sostenible, mientras que otras especies son sobre-explotadas y están en peligro de extinción. Por eso, el hombre ha recurrido al cultivo artificial de algunas de ellas, como forma de preservar las poblaciones naturales y lograr el incremento en la producción de alimentos que se requiere.³ Entre las características que favorecen el cultivo de camarones peneidos se encuentran: ciclo de vida corto, alta fecundidad, baja tasa de mortalidad en el cultivo, crecimiento rápido, respuesta positiva a la suplementación alimenticia, resistencia a cambios ambientales y alto valor comercial.⁴

El camarón rosado *Farfantepenaeus duorarum* constituye un recurso pesquero valioso en el sureste del Golfo de México. A pesar de la importancia económica de esta especie, la información disponible sobre la biología y ecología de las diferentes fases de su ciclo de vida es escasa, en particular respecto a los estadios que habitan los sistemas estuarinos en la región del Golfo de México.⁵ La pesquería de camarón rosado en la Sonda de Campeche registró capturas de alrededor de 20,000 toneladas a mediados de la década de los 70's. Desde entonces presenta una tendencia decreciente, que se hizo más evidente desde 1986; y a partir de 1990 presenta niveles de producción muy bajos, con registros inferiores a 2,000 toneladas desde 1997. Las posibles causas del colapso se han relacionado con efectos de la

sobrepesca, los cambios en el hábitat (por obras de desarrollo costero y contaminación) y la presencia de fallas en el reclutamiento.⁶

Biología del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum*

1. Taxonomía

Como miembros de los crustáceos, los camarones son artrópodos mandibulados con apéndices articulados, con dos pares de antenas, caparazón y branquias.⁷

Los camarones de la familia Penaeidae, son considerados entre los más importantes a nivel mundial, tanto para la pesca como para el cultivo (Cuadro 1).

Cuadro 1.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CAMARÓN ROSADO DEL GOLFO DE MÉXICO *Farfantepenaeus duorarum*

Reino	Animal
Phylum	Arthropoda
Superclase	Crustacea (Pennant, 1777)
Clase	Malacostraca (Latreille, 1803)
Subclase	Eumalacostraca
Orden	Decápoda (Latreille, 1803)
Suborden	Dendrobranquiata (Bate, 1 888)
Superfamilia	Penaeoidea (Rafinesque-Shmalts, 1 815)
Familia	Penaeidae (Pérez-Farfante, 1988)
Género	<i>Farfantepenaeus</i> (Burukovsky, 1997)
Especie	<i>douradum</i> (Burkenroad, 1939)

2. Distribución geográfica y abundancia

La gama de camarón rosado *Farfantepenaeus duorarum* se extiende desde la Bahía de Chesapeake hacia el sur a lo largo de las costas de los Cayos de Florida y el Golfo de México. En el Golfo se extiende de las Islas Tortugas a lo largo de la costa del Golfo de los Estados Unidos y a través de las aguas costeras de México hasta Cabo Catoche y el sur de Isla Mujeres. También se ha encontrado en las Islas Bermudas. La mayor población de camarón rosado está fuera del suroeste de Florida y en la porción sureste del Golfo de Campeche. Por lo tanto, el Golfo de México se considera el centro de distribución de esta especie (Figura 1).⁸ Se tienen registros de que las mayores poblaciones de juveniles se encuentran principalmente en dos localidades: el estero de Sabancuy y Champotón.⁹

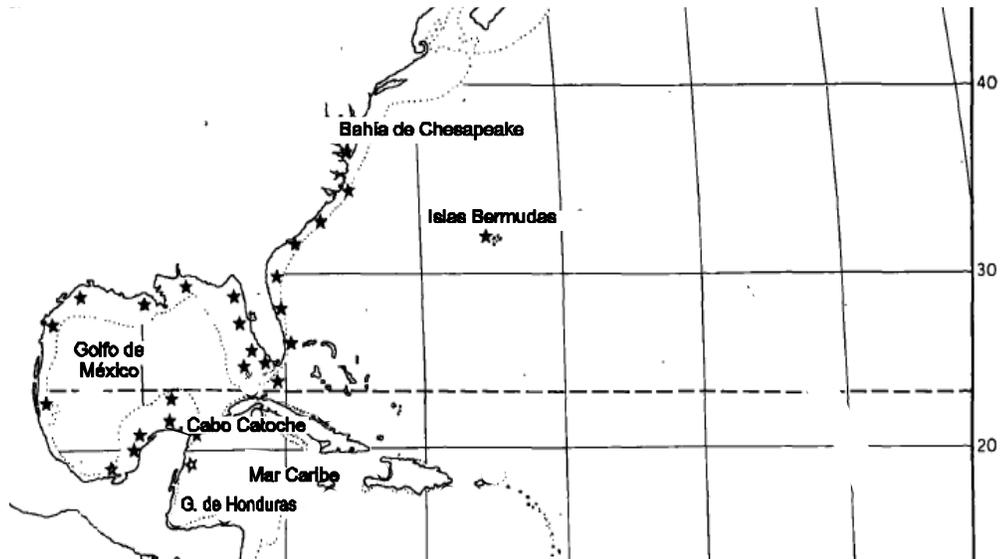


Figura 1. Distribución de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* (★).

3. Morfología

El cuerpo de los camarones peneidos se divide en tres regiones: cefalotórax, abdomen y telson (Figura 2). Los apéndices del cefalotórax son las anténulas, antenas y mandíbulas, maxilas, maxilípedos (las tres con funciones sensoriales) y pereiópodos (función locomotriz); el abdomen está formado por seis segmentos y cinco pares de apéndices llamados pleópodos (función natatoria). En el telson se encuentran los urópodos, que sirven también para la natación. En el cefalotórax se concentran la gran mayoría de órganos vitales y sensoriales.¹⁰

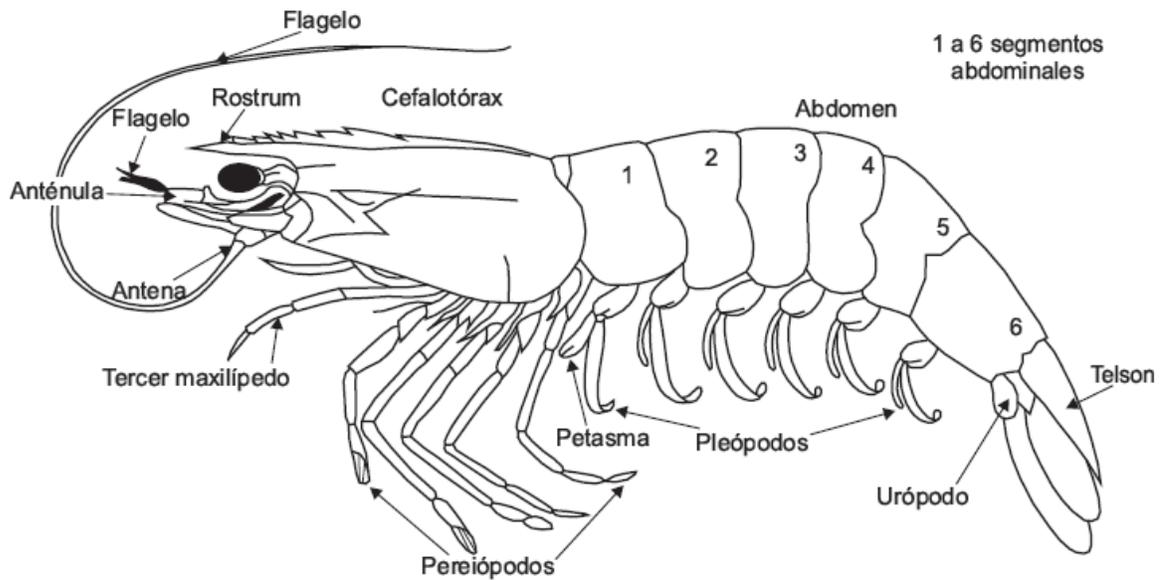


Figura 2. Esquema de un juvenil de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* señalando las tres regiones morfológicas.

4. Comportamiento

Los organismos de esta especie tienen marcada preferencia por los fondos carbonatados, arenosos y arenosos con conchuela. Específicamente los juveniles de esta especie tienen cierta dependencia a las zonas de pastos marinos.¹¹ Los adultos se encuentran

principalmente en fondos firmes, en zonas lodosas y arenas coralinas, algunas veces entre fragmentos de concha.¹² Muestran un claro comportamiento relacionado con el fotoperiodo, son activos durante la noche e inactivos durante el día ya que permanecen enterrados, por lo tanto su actividad tiene una periodicidad circadiana.¹³

5. Reproducción y ciclo de vida

La temperatura y la salinidad son factores determinantes en el ciclo de vida del camarón rosado, influyendo en el crecimiento, mortalidad, migración y reproducción.¹⁴ Los machos maduran cuando alcanzan los 85 mm de longitud total, 5.0 g de peso total y 2.5 a 3 meses de edad; la talla máxima usual es de 175 mm (9 a 12 meses). Llegan a vivir de 18 a 20 meses. El 50 % de las hembras se encuentra en estado de total madurez sexual cuando llegan a los 127 mm de longitud o a los 17 g de peso (edad de 4.5 meses). Cuando miden 140 mm ya desovaron cuando menos una vez. Las hembras reproductoras se encuentran desde los 15 m de profundidad y producen entre 211 mil a 450 mil huevos.¹⁵

El proceso reproductivo inicia con la cópula, en la que el macho adhiere a la hembra el espermatóforo (saco que contiene los espermatozoides). La fecundación es externa: la hembra desova y rompe el espermatóforo. La fertilización de los óvulos ocurre en el medio marino.¹⁶ Esta fertilización origina un huevo demersal que al eclosionar da lugar a una larva nauplio de características planctónicas. Los siguientes estadios (zoea y mysis) mantienen esta condición, en tanto que las post-larvas adquieren el hábito bentónico antes de ingresar a las aguas costeras de donde emigran juveniles para continuar su desarrollo en aguas marinas (Figura 3).¹¹

Es una especie de tónico cerrado.¹⁶ Hay una temporada de reproducción masiva con un pico en abril y otro pico máximo en junio-julio,¹⁵ aunque otros investigadores determinan este segundo pico máximo durante agosto- septiembre.¹⁷

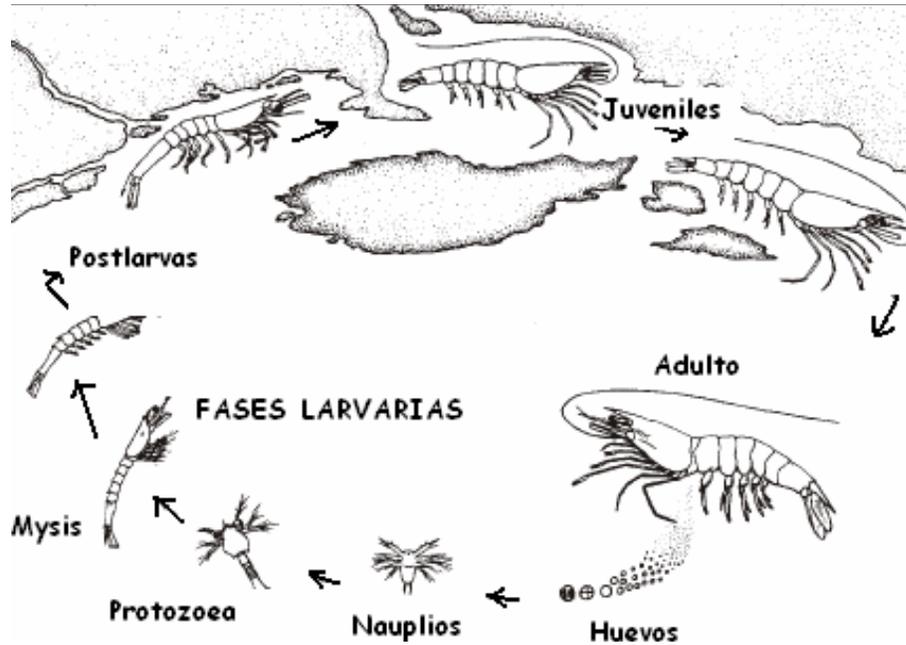


Figura 3. Ciclo de vida del camarón.

Su alimentación varía durante el transcurso del ciclo de vida. El espectro trófico abarca desde el microplancton y zooplancton en la etapa larvaria hasta otros organismos bénticos en la etapa juvenil y adulta. Esta especie se puede considerar omnívora, aunque también ingiere detritus.¹⁸

6. Sistema digestivo

La descripción de la morfología funcional del sistema digestivo de los decápodos se ha concentrado principalmente en el registro de los movimientos de las partículas del alimento.¹⁹ La estructura del sistema digestivo del camarón está compuesta por esófago (e),

estómago cardiaco (ec), filtro glandular (f), hepatopáncreas (h), intestino medio (i) y recto (r) (Figura 4).²⁰

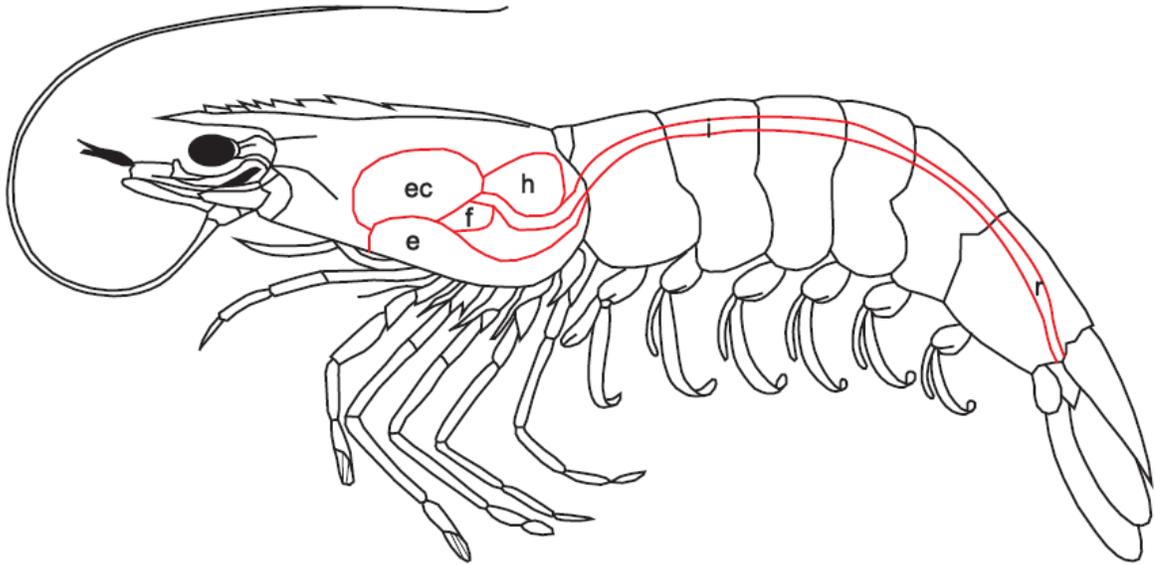


Figura 4. Esquema del tracto digestivo del camarón.

Se ha propuesto con base en la morfología del tracto digestivo que una vez que el alimento entra a la cámara anterior del proventrículo, este se mezcla con los fluidos provenientes de la glándula digestiva que fluyen hacia delante en el surco de la cámara posterior. La trituración y la mezcla posterior con los fluidos ocurren en los oscículos del molino gástrico. La masa de alimento es manipulada continuamente por las placas laterales de la cámara anterior y es forzada hacia el molino gástrico. Eventualmente los fluidos pasan de la masa de alimento hacia el surco ventral de la cámara anterior. Después de pasar por el molino gástrico el alimento es tamizado por un filtro prensa, el cual permite solamente el paso de fluidos y partículas finas para entrar a la glándula digestiva y dar paso a la digestión final y la absorción (Figura 5).²¹

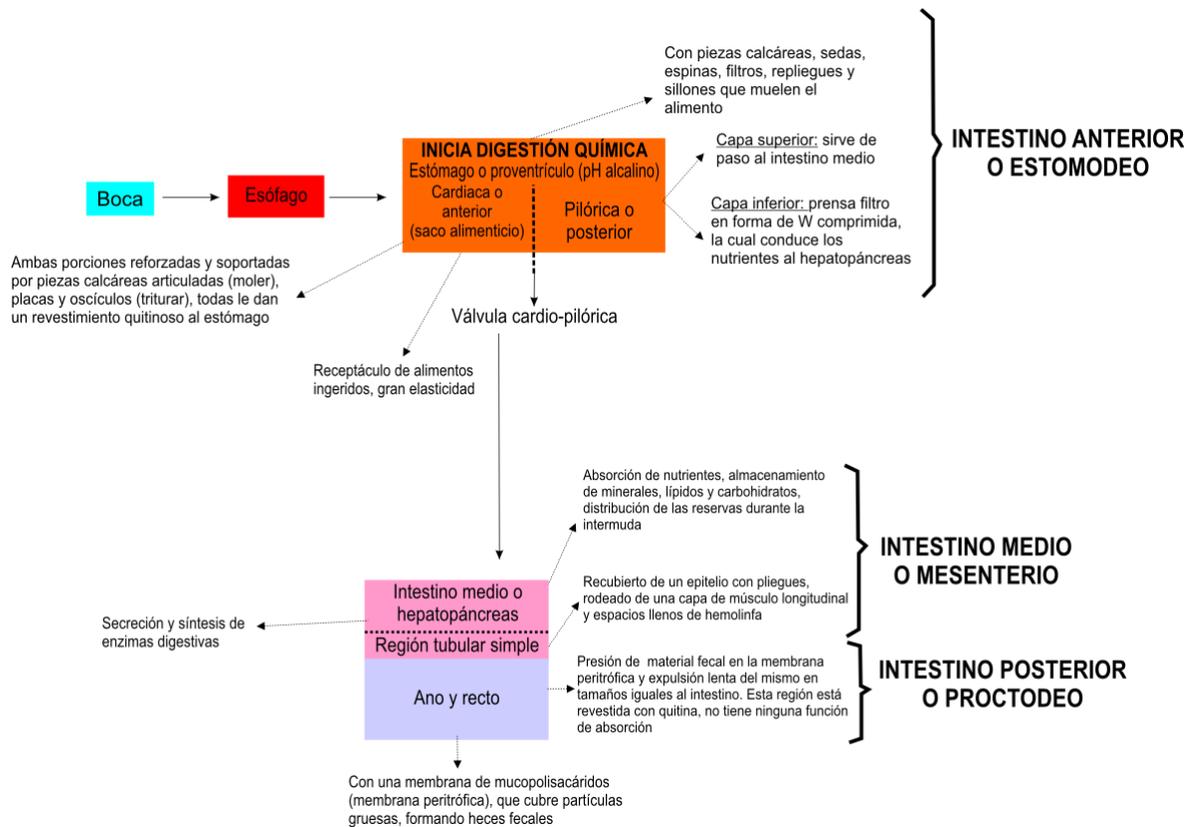


Figura 5. Esquema de la digestión del camarón

7. Digestión química

La degradación química de los alimentos se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente de la glándula del intestino medio, glándula digestiva o hepatopáncreas, el cual es un órgano compacto bilobulado que ocupa gran parte del cefalotórax.²² Este órgano tiene tres funciones principales: secreción y síntesis de enzimas digestivas, retención temporal y cíclica de reservas y la absorción de nutrientes que son producto de la digestión, almacenamiento de lípidos y glucógeno y distribución de minerales y sustancias orgánicas.²³ Interviene además en algunos procesos de osmorregulación,²² vitelogénesis, excreción y detoxificación de metales y sustancias

orgánicas extrañas.²⁴ En el epitelio funcional de los túbulos del hepatopáncreas se pueden identificar cuatro tipos celulares, que según la nomenclatura de Jacobs son: E (embrionalenzellen), F (fibrillenzellen), R (resorptionzellen) y B (blasenzellen).²⁵

Las células E se diferencian en los otros tipos de células.²⁰ Las células F tienen una alta tasa de síntesis de proteína²⁶ y son las únicas que sintetizan enzimas digestivas.²⁷ Se les ha atribuido además funciones de almacenamiento de minerales.²⁸ Las células R son las más abundantes, almacenan lípidos y glucógeno como reserva, mismos que pueden ser movilizados proveyendo energía durante los periodos de inanición, muda y reproducción.^{27,29} También intervienen en el proceso de detoxificación del organismo, eliminando metales pesados mediante su acumulación en forma insoluble en el citoplasma antes de excretarlos.³⁰ Las células B están involucradas en la absorción de nutrientes, digieren los materiales absorbidos, los concentran y secretan al final del proceso digestivo.²⁰

Las fuentes de proteína

El reto actual en la alimentación de especies acuáticas es encontrar dos aspectos esenciales: Uno es maximizar el rendimiento técnico de la producción mediante el desarrollo de alimentos de acuerdo a las necesidades fisiológicas (metabolismo basal, almacenamiento, reproducción, crecimiento y excreción) de cada especie en sus diferentes estadios productivos. Otra, es maximizar el rendimiento económico mediante el desarrollo de alimentos desde una perspectiva tecnológica, considerando tanto el valor nutritivo, costo, disponibilidad y facilidad de procesamiento en las diferentes materias primas.³¹ Desde el punto de vista nutricional, la proteína, considerada como el nutriente más costoso en la dieta es

de suma importancia porque los aminoácidos son usados por el organismo para su crecimiento.³²

El rango de contenido proteico (referido como proteína cruda) en los alimentos para camarón va desde 20% hasta >60%.³³ En el caso de juveniles del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum*, el requerimiento de proteína reportado es del 30%.³⁴ Cabe destacar que las distintas fases del ciclo de vida del camarón requieren diferentes niveles de proteína.³⁵ Las postlarvas necesitan valores más elevados que los juveniles porque es en esta etapa donde el camarón alcanza su máximo desarrollo, por lo que el requerimiento proteico es aún muy alto, ya que con la edad este requerimiento va disminuyendo, porque la proteína ya no se usa para crecimiento, sino para mantenimiento.³⁶ En el caso de postlarvas del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* se reporta un requerimiento de proteína del 40-50%.³⁷

Las proteínas son compuestos orgánicos complejos de alto peso molecular que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, se forman por polimerización de aminoácidos. De los aminoácidos que forman las proteínas, se han aislado 23 aminoácidos naturales, de los cuales 10 son considerados esenciales para todas las especies (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina).³⁸

Las diferencias físicas y químicas entre los aminoácidos, dan origen a las proteínas con diferentes conformaciones estructurales, por tanto, tales diferencias son un factor importante en la definición de las funciones de una proteína específica.³⁹

Las proteínas son consideradas constituyentes orgánicos del tejido animal, representando entre 65-75% del total en base seca, mismas que son usadas continuamente para crecimiento, reposición de tejidos y metabolismo normal, además una parte es convertida en energía. Una proteína inadecuada en la dieta resulta en la reducción o suspensión del

crecimiento, seguida por una pérdida de peso debido a la extracción de proteínas del tejido para mantener las funciones vitales.⁴⁰

Las proteínas de origen animal son las más usadas en alimentación para camarón. La harina de pescado es el ingrediente más utilizado como fuente de proteína, ácidos grasos, fosfolípidos y minerales en acuicultura.⁴¹ Debido a las limitaciones en el suministro de harinas de pescado, tales como un tratamiento inadecuado de la materia prima que causa una pérdida de sus propiedades nutricias y funcionales y alto costo en el mercado,³² se están dedicando importantes esfuerzos de investigación para sustituir este ingrediente proteico por proteínas alternativas de origen vegetal como: harina de soya, canola y lupino,⁴² siendo la harina de soya la más utilizada por contar con un buen perfil nutricional y ser de más bajo costo que la harina de pescado.⁴³

Las proteínas vegetales son usadas en menor grado en las dietas para camarón porque son menos atractantes y su composición en aminoácidos es menos balanceada. También contienen ácidos grasos de cadena más corta que los productos marinos y muchas contienen productos tóxicos como el factor anti-trípico de la soya, el gossipol del algodón, aflatoxinas u otros hongos muy tóxicos. Debido a esto la proteína vegetal debe seleccionarse con mucho cuidado.⁴⁴ La soya es la fuente proteica de origen vegetal más utilizada en la alimentación de organismos acuáticos.⁴⁵ Los factores anti-nutricionales mencionados anteriormente pueden ser inactivados o eliminados con diversos tratamientos con calor como son el tostado, extrusión y peletización. Posee además anti-nutrientes resistentes al calor, entre los que se encuentran el ácido fítico, que afecta su valor alimenticio al reducir la biodisponibilidad de fósforo (P^{3+}) y otros minerales (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) y proteínas, así como saponinas que reducen la palatabilidad de los alimentos cuando se preparan con niveles elevados de este ingrediente.⁴⁶

La canola se ha empleado como reemplazo a la harina de pescado en dietas para algunas especies acuícolas como el pez gato (*Ameiurus melas*)⁴⁷ y tilapias.⁴⁸ Esta contiene altos niveles de proteína de excelente calidad y su composición en cuanto a aminoácidos es similar a la de la soya. Sin embargo, contiene altos niveles de taninos,⁴⁹ fitatos y fibra, siendo estos dos últimos los causantes de un decremento de la digestibilidad de los nutrientes, por lo que se recomienda un máximo de 20% como nivel de inclusión.⁵⁰

Se ha demostrado que a pesar de que algunos peneidos presentan requerimientos proteicos elevados, admiten en su dieta una alta proporción de proteína de origen vegetal.⁵¹ No obstante, a diferente grado de utilización de proteína animal o vegetal en la dieta por las distintas especies de camarones, probablemente existe una optimización en su aprovechamiento, por lo que son necesarios estudios futuros en la fisiología y bioquímica de la nutrición para dilucidar esta interrogante.⁵²

Digestibilidad

Existe un indicador de la calidad del alimento muy importante y útil que hasta la fecha, debido a que es costoso y laborioso no se ha solicitado a los fabricantes de alimentos y es la digestibilidad o la disponibilidad de nutrientes contenidos en los alimentos. Desafortunadamente, los ingredientes más digestibles y de mejor calidad nutricional, son los más caros y eso provoca automáticamente el aumento del precio del alimento. Sin embargo, también es cierto que si el alimento es más digestible, se necesita menos para cubrir los requerimientos de crecimiento, lo cual puede compensar con beneficios la inversión inicial. Esto está claramente reflejado en el factor de conversión alimenticia, que se evalúa a lo largo del cultivo en una granja. La digestibilidad aparente de un alimento o

de un ingrediente se puede evaluar con camarones en medio controlado, de tal manera que a diferencia de los bioensayos en granja, se evalúa la digestibilidad única y exclusivamente del alimento en cuestión.⁴⁴

Las fuentes de proteína más usadas en alimentos para camarón son harina de pescado y de soya, que contienen proteína razonablemente bien digerida (alrededor de 80%) por el camarón, pero no todas las fuentes tienen la misma calidad o digestibilidad. Por esta razón, los productores deben tener cuidado en la calidad de la proteína usada en los alimentos.⁵³

Los atributos más destacables en una harina de pescado son el alto contenido de aminoácidos, alta digestibilidad y ausencia de factores anti-nutricionales, que están presentes en fuentes de proteína vegetal. Las harinas de pescado pueden ser elaboradas de diferentes especies, con pescados enteros o con subproductos (desechos de fileteo, vísceras).⁵⁴ La calidad de la harina de pescado varía con la especie que se utiliza, la frescura de la materia prima y las condiciones del proceso de elaboración afectando la digestibilidad de la proteína; por otro lado, cuando las proteínas son expuestas a temperaturas muy altas, la digestibilidad de la proteína se reduce, esto es debido a las reacciones entre los aminoácidos y otros compuestos, evitando que las moléculas proteicas sean desdobladas por enzimas digestivas.⁵⁵ Por tanto, se debe tener mucho cuidado con su calidad; una buena harina de pescado debe tener pocos lípidos y cenizas, un bajo índice de oxidación de lípidos y no debe contener histamina, ya que el crecimiento se ve afectado.⁴⁴

El conocimiento de la digestibilidad de proteína por organismos cultivados tiene beneficios económicos y ecológicos, ya que actualmente, para cubrir los requerimientos de aminoácidos para cada organismo en particular, la dieta se formula con un exceso de proteína. Tanto la proteína no consumida y la no digerida se acumulan en el medio, aumentando el contenido de nitrógeno del agua en los estanques de cultivo, afectando

negativamente el rendimiento de los organismos cultivados y la calidad del agua de los estanques a causa de un aumento de nitritos, nitratos y amonio.³² La información sobre digestibilidad es esencial para evaluar la calidad de un ingrediente. Aunque el perfil de nutrientes de un ingrediente aparentemente sea bueno, si sus nutrientes no son digeridos, absorbidos y utilizados, serán de poco valor para el animal.⁴⁴

Importancia de la enzima fitasa en dietas para camarón

La fitasa (mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolasa) es una enzima que degrada a los fitatos para liberar P^{3+} y otros nutrientes. Pertenece al grupo de las fosfatasas ácidas; cataliza la unión hidrolítica de los ésteres de ácido fosfórico de inositol y por lo tanto, libera ortofosfatos que pueden ser absorbidos. Al mismo tiempo, se pueden desligar minerales como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} y ser convertidos a formas absorbibles.⁵⁶ Se conocen dos tipos de fitasas: 3-fitasas y 6-fitasas, que inician la desfosforilación del anillo de mio-inositol en la posición 3 y 6, respectivamente. Las 3-fitasas suelen estar presentes en microorganismos, mientras que las 6-fitasas se encuentran generalmente en las semillas de plantas.⁵⁷ Son de gran interés por su aplicación en la reducción del contenido de fitato en alimentos para animales y consumo humano, incrementando además la disponibilidad de P^{3+} y otros minerales nutricionalmente importantes.⁵⁸

Estas enzimas son consideradas importantes aditivos de alimentos debido a la hidrólisis enzimática del ácido fítico, un factor anti-nutricional presente en la mayoría de los alimentos hechos a base de cereales o leguminosas. La inclusión de fitasa en la dieta a base de harinas de origen vegetal para la nutrición de peces y otras especies de interés en la

acuicultura ha sido sugerida para reducir la excreción de P^{3+} hacia el agua y disminuir el efecto contaminante. De acuerdo a las características fisiológicas de esta especie, las fitasas adecuadas para la alimentación del camarón deben tener una actividad a valores de pH de 7 a 8, y a un intervalo de temperatura de 26-32°C debido a las condiciones presentes en el aparato digestivo de esta especie y en el medio de cultivo, ya que el pH de su sistema digestivo oscila entre 5.5 a 9. Además, se requiere que estas posean resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas del camarón, estabilidad a las temperaturas empleadas en el proceso de los alimentos, y una baja lixiviación en las preparaciones extruidas e introducidas en los estanques. A pesar de los resultados positivos obtenidos hasta el momento en el empleo de fitasa en la alimentación de peces y otras especies de interés en acuicultura, es necesario optimizar las características de las fitasas para esta aplicación específica, ya que las fitasas que actualmente son disponibles de forma comercial han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves.⁵⁹ En peces, el empleo de fitasas en preparaciones nutrimentales para camarón ofrece una alternativa para resolver los efectos anti-nutricionales de los fitatos presentes en las harinas vegetales; sin embargo, en camarón se han realizado pocos estudios.⁶⁰

El papel del fósforo en la alimentación

Existen en la Tierra más de 90 elementos presentes en forma natural; 60 de ellos se han encontrado en tejidos vegetales. Sin embargo, no todos se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas. Se ha demostrado que 16 elementos son esenciales y nueve de ellos se requieren en cantidades grandes (más de 0.05% en peso seco) y por tanto, se conocen como macronutrientes. Se trata de C^{2+} , H^{1+} , O^{2+} , N^{1+} , P^{3+} , K^{2+} , S^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Los siete micronutrientes restantes (Na^{1+} , I^{1+} , Fe^{2+} , y Zn^{2+}) son necesarios en cantidades traza (menos de 0.05% en peso seco) para el crecimiento y el desarrollo normales de la planta.⁶¹

En la mayoría de los alimentos de origen vegetal, el P^{3+} se almacena en las semillas, tanto en forma orgánica como inorgánica. La parte inorgánica se encuentra en forma de fosfolípidos y compone principalmente de fitatos, una mezcla de sales de Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{2+} del mio-inositol hexaquisfosfato también llamado ácido fítico. Éste forma fácilmente complejos con varios minerales esenciales, tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y $\text{Fe}^{3+,2+}$ y también con proteínas.⁶² La principal función del ácido fítico en el crecimiento de las plantas puede ser de almacenamiento de P^{3+} .⁶³

La importancia del P^{3+} en dietas para camarón radica en que es el componente esencial del exoesqueleto, de fosfolípidos, ácidos nucleicos, fosfoproteínas y ésteres de fosfato altamente energéticos (ATP), por lo que juega un papel importante en el metabolismo celular y energético. Es esencial para el crecimiento y el mantenimiento de la homeostasis mineral, siendo uno de los elementos minerales más versátiles.⁶⁴ La pasta de soya y de canola son ampliamente utilizadas en dietas para organismos marinos; sin embargo, presentan un inconveniente que está relacionado con la presencia de P^{3+} ,⁶⁵ que se encuentra como ácido fítico, forma que no resulta disponible para animales monogástricos que carecen o presentan insuficiente actividad de fitasa.⁶⁶

Por su alta carga negativa, el ácido fítico presenta una alta afinidad con componentes con carga positiva,⁶⁷ por ello, es considerado como un factor anti-nutricional por su acción quelante de minerales (Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Fe}^{3+,2+}$, Zn^{2+} , $\text{Cu}^{2+,1+}$, Mn^{4+} , Mo^{6+} y $\text{Co}^{2+,3+}$) y la

interacción con proteínas importantes en la nutrición, convirtiéndolos en no asimilables para el organismo bajo condiciones fisiológicas.⁵⁹ Debido a que el ácido fítico no puede ser absorbido por los organismos, se tiene que suplementar la dieta con P^{3+} inorgánico para cubrir los requerimientos del mismo. Sin embargo, esta estrategia puede resultar cara a nivel producción, debido a la baja disponibilidad del P^{3+} inorgánico en el mercado y por la desventaja de provocar el aumento de altas concentraciones de este mineral que son excretadas por el animal.⁵⁸

En situaciones normales, la mayor parte del P^{3+} fítico aparece en las heces, incrementando el problema de contaminación ambiental (eutrofización) en ríos y sistemas estuarios adyacentes a las granjas de engorda de camarón, provocando floración de cianobacterias, hipoxia y muerte de organismos acuáticos.^{68,58}

La eutrofización es el enriquecimiento de cuerpos de agua con materia orgánica, ocasionado principalmente por el alimento no consumido y lixiviado⁶⁹ y por la fertilización orgánica e inorgánica en las granjas acuícolas.⁷⁰ La acumulación excesiva de materia orgánica y de otros elementos como el N^{1+} y P^{3+} , puede causar serios problemas en los ecosistemas receptores de las descargas, como florecimientos explosivos de fitoplancton,⁷¹ algunas veces de especies tóxicas, enterramiento y muerte de comunidades bentónicas en las áreas cercanas a la descarga, olores indeseables y probable presencia de organismos patógenos.⁷² La magnitud del problema está relacionada con la intensificación del sistema de cultivo y consecuentemente del tipo y cantidad de alimento artificial empleado.^{69,73} Una alternativa ante esta problemática es la hidrólisis del ácido fítico mediante la acción de la enzima fitasa, mejorando en proporciones variables la absorción y retención del P^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} y aminoácidos,⁷⁴ después de hidrolizar los fitatos durante la

digestión o durante el procesamiento del alimento,⁷⁵ logrando de esta manera reducir hasta un 50% la problemática de la contaminación ambiental por minerales al utilizar la enzima.⁷⁶

Estudio de la digestibilidad en alimentos para camarón

El conocimiento de la digestibilidad aparente de los alimentos balanceados para camarón tiene como objetivo la búsqueda del contenido nutrimental del alimento y permite realizar una formulación más precisa de la dieta pudiendo así disminuir la cantidad de proteína o bien utilizar fuentes de proteína de menor costo, reduciendo substancialmente el precio del alimento.⁷⁷ La medición del Coeficiente de Digestibilidad Aparente provee una estimación de la disponibilidad de los nutrientes en los ingredientes y alimentos. Esta puede ser medida gravimétricamente por el cálculo del consumo del alimento y la producción de heces; o indirectamente por la medición de la concentración de un marcador inerte en el alimento y en las heces (*in vivo*).⁷⁸

La digestibilidad *in vivo* es el establecimiento de un balance apropiado entre los nutrientes que entran a partir de los alimentos y los que salen en las heces.⁷⁹ Esto indica que el alimento debe ser digerible para que pueda ser asimilado y por consecuencia, aprovechado por el organismo.⁸⁰ En la digestibilidad intervienen dos procesos: en primer lugar la digestión, que corresponde a la hidrólisis de moléculas complejas por medio de enzimas y la digestibilidad en sí, que consiste en la asimilación de las moléculas pequeñas (aminoácidos y ácidos grasos) en las células del hepatopáncreas.⁸¹

Para determinar la medición precisa de la cantidad de alimento consumido y la cantidad de heces producidas se utilizan marcadores inertes. Las técnicas a base de marcadores inertes

han sido muy utilizadas en los estudios de digestibilidad.^{82,83,84,85,78} Estos deben ser totalmente indigestibles, no absorbibles, no deben tener ninguna acción farmacológica en la zona intestinal, deben pasar a través del intestino y ser evacuados a la misma tasa que otros contenidos del intestino, la cantidad de indicador ingerido y evacuado debe darse en periodos de tiempo iguales, el indicador no debe cambiar el sabor del alimento para no afectar su atractabilidad y debe medirse fácilmente por métodos químicos.⁷⁹

El marcador más utilizado en camarones es el óxido de cromo.^{86,87,88} Sin embargo, varios autores han cuestionado su utilización. Algunos autores sugieren no utilizar el óxido de cromo teniendo en cuenta el riesgo de explosión durante el manejo⁸⁹ o utilizar marcadores diferentes a este en los estudios de digestibilidad en camarones.⁹⁰

Faucon (1997) utilizó el método de Cenizas Insolubles en Ácido (AIA) en estudios de digestibilidad en el camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. Este método tiene la particularidad de ser muy sencillo y no necesita equipos sofisticados.⁸⁹ Por su parte, el Institut Francais de Recherche pour l'exploitation de la Mer (IFREMER) de Tahiti, ha trabajado con este método desde hace varios años obteniendo muy buenos resultados. Suárez (2008) presenta un resumen de los diferentes marcadores utilizados y propone la utilización de zeolita como marcador inerte, ya que cumple con las características requeridas para un marcador (Cuadro 2).⁹¹

Cuadro 2

**PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD APARENTE EN CAMARONES USANDO
COMO MARCADOR INERTE EL ÓXIDO DE CROMO Y LA ZEOLITA**

Especie	Digestibilidad Aparente	Marcador	Concentración del marcador	Ingrediente/ nutriente en estudio
<i>L. vannamei</i>	Materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos, energía	Cr ₂ O ₃	0.5%	Harina de cangrejo <i>Pleuroncodes planipes</i>
<i>P. monodon</i>	Materia seca, proteína, lípidos, energía	Cr ₂ O ₃	0.5%	Lecitina de soya, aceite de pescado, aceite de girasol
<i>L. vannamei</i>	Materia seca, proteína, lípidos, energía	Cr ₂ O ₃	1.00% 0.5%	Harina de soya
<i>L. vannamei</i>	Proteína	Cr ₂ O ₃	1.00%	Calamar seco por calor, hidrolizado de pescado
<i>L. stylirostris</i>	Materia seca, proteína, lípidos, energía	Zeolita	3.00%	Alimento para juveniles

Estudio de enzimas digestivas

El conocimiento sobre enzimas digestivas permite realizar una mejor formulación del alimento, presentación de dietas y reducir efectos indeseables por la presencia de compuestos anti-nutricionales.⁹² El tipo y funcionalidad de las enzimas digestivas presentes en cualquier especie acuática es el resultado de un proceso evolutivo en el que el principal factor de selección ha sido sin duda el régimen alimenticio, tanto desde el punto de vista de composición de alimento ingerido, como de las pautas de alimentación. Cuando los humanos han seleccionado especies acuáticas para su cría en cautividad, con frecuencia han modificado de manera radical tanto las características del alimento suministrado en relación

al alimento natural de dicha especie (tipo de ingredientes, densidad energética y proteica, aspecto físico, palatabilidad), así como los patrones de alimentación en relación con los ritmos biológicos normales o la edad de los individuos. Todas estas modificaciones tienen profundas repercusiones en la efectividad con que el alimento es procesado, en buena medida porque las enzimas digestivas pueden no ser producidas en cantidad suficiente para mantener una relación enzima/sustrato adecuada a la composición de dicho alimento, pueden no estar actuando en las condiciones más adecuadas en cuanto a pH y/o temperatura o pueden estar siendo afectadas por sustancias presentes en el alimento que las inhiban o inactiven parcialmente. Cada uno de estos aspectos plantea diferentes líneas de investigación que han sido abordadas en mayor o menor medida para diferentes especies. De hecho, existe gran cantidad de trabajos sobre bioquímica digestiva en especies de organismos acuáticos. Desde un punto de vista descriptivo, el estudio de la bioquímica digestiva en organismos acuáticos tendría como objetivos determinar cuantitativa y cualitativamente las enzimas presentes en las diferentes especies y sus variaciones a lo largo del desarrollo, así como estudiar los factores que influyen en su producción y actividad. Existen posibles campos de aplicación derivados del conocimiento de la bioquímica digestiva, tales como llevar a cabo suplementaciones con enzimas no presentes en el tracto digestivo de crustáceos y peces que mejoren la utilización de determinados compuestos (por ejemplo, fitasas) o emplear la actividad de enzimas como indicador del estado nutricional del animal.³¹

El conjunto de las enzimas proteolíticas del camarón está constituido por dos grupos: endopeptidasas, que cortan los enlaces peptídicos en el interior de las cadenas proteicas y las exopeptidasas, que cortan los enlaces peptídicos aminoterminales, carboxiterminales y

los dipéptidos. En los crustáceos, la digestión química de las proteínas comienza en la cavidad cardiaca del estómago y continúa en los túbulos del hepatopáncreas. El modelo de degradación de proteínas consiste en la ruptura de las proteínas ingeridas por las endopeptidasas, degradación de los péptidos por las exopeptidasas y absorción a nivel de células especializadas del hepatopáncreas.⁹³ El sistema digestivo del camarón presenta proteinasas y peptidasas. Dentro de ellas se encuentran la tripsina y la quimotripsina que son identificadas por su especificidad por el sustrato. La tripsina hidroliza enlaces peptídicos formados por el grupo carboxílico de un aminoácido básico como arginina y lisina. La quimotripsina hidroliza enlaces peptídicos formados por un grupo carboxílico de un aminoácido aromático como fenilalanina, tirosina y triptófano.⁹⁴ La tripsina representa por sí sola el 60% de la actividad proteásica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos. La importancia relativa de esta enzima y su especificidad hacia los aminoácidos básicos que son esenciales en la nutrición de crustáceos hace resaltar el problema de la calidad de las proteínas que se utilicen en su alimentación, en este caso un alimento balanceado. Estas proteínas deben contener los aminoácidos esenciales en cantidad óptima.⁹³

Algunas enzimas digestivas (α -amilasa y tripsina) se ven afectadas por la presencia de fitato, lo que podría deberse a la unión de éste con la proteína o con los cationes esenciales para la actividad enzimática.⁹⁵ El pH óptimo para una actividad enzimática adecuada en camarones varía, y puede estar entre 5.5. a 9.⁹⁶ Teniendo conocimiento sobre la actividad enzimática podemos deducir qué ingredientes podrán ser utilizados en la fabricación de alimentos balanceados. En cuanto a fuentes de proteína, dada la importancia de la tripsina, mientras más aminoácidos básicos tenga la proteína, la capacidad de hidrólisis será mayor, al igual que la digestibilidad y la eficiencia alimenticia.⁹³

ANTECEDENTES

Usos y limitaciones de la proteína vegetal y sus factores anti-nutricionales

En la búsqueda de una producción sostenida de alimentos para satisfacer la creciente demanda de la industria acuícola, deben seleccionarse ingredientes que además de ser económicos, tengan una amplia disponibilidad en el mercado.

Ahamad (1992) evaluó algunas fuentes de proteína animal (harina de carne de almeja, harina de pescado, harina de camarón mantis, harina de desechos de camarón y crisálida del gusano de seda) y vegetal (torta de coco y torta de cacahuete) y la digestibilidad de ambas en el camarón de la India *Penaeus indicus*, encontrando que la proteína animal era superior a la fuente de proteína vegetal, ya que la primera produjo un mejor crecimiento. Sin embargo, la digestibilidad de las fuentes de proteína animal fue menor que las vegetales. Se cree que esto pueda deberse al perfil de aminoácidos entre ambas fuentes, ya que la proteína animal es rica en lisina, mientras que la limitante de la proteína vegetal es la deficiencia en este aminoácido.⁹⁷

Chamberlain (1999) menciona que aunque ya se cuenta con tecnologías mejoradas para la remoción de factores anti-nutricionales de los ingredientes de origen vegetal que permiten incrementar su tasa de inclusión en alimentos acuícolas,⁹⁸ persiste el problema de que niveles altos de inclusión de estos ingredientes han mostrado reducir la palatabilidad de los alimentos, principalmente en especies carnívoras. La soya es el ingrediente que mejor ejemplifica lo anterior y es también la fuente proteínica de origen vegetal más estudiada.⁹⁹

En la industria de alimentos se están utilizando cada vez con mayor frecuencia enzimas que aumentan la actividad enzimática en el tracto digestivo y por lo tanto aumentan la eficiencia de utilización de los alimentos. Buchanan, *et al.* (1997) trabajaron con juveniles del camarón negro *Penaeus monodon* y obtuvieron un aumento en el valor nutritivo de alimentos balanceados y manufacturados con altos porcentajes de ingredientes de origen vegetal, mediante la adición de enzimas exógenas.¹⁰⁰ Davis y Arnold (1998) reportan una mejora en los valores de digestibilidad aparente en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* por el uso de una enzima proteolítica en el alimento.¹⁰¹

Beneficios y limitaciones del uso de fitasa

En diversos estudios se ha mostrado que la adición de fitasa en dietas a base de soya incrementa el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de P^{3+} en diversas especies de peces, tales como la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, el salmón del Atlántico *Salmo salar L.* y la tilapia *Oreochromis niloticus*.⁵⁸ No obstante, los resultados son inconsistentes. Van Weerd (1999) realizó pruebas en el pez gato Africano *Clarias gariepinus* para evaluar el efecto en el crecimiento con dietas a base de harina de soya pre-tratada con fitasa, sobre el consumo de alimento y balance de nutrientes. El reemplazo de harina de pescado por harina de soya, llevó a una disminución en el índice de crecimiento y los parámetros de utilización del alimento. Los resultados indicaron un efecto positivo con el pre-tratamiento con fitasa, particularmente en la digestibilidad y retención de P^{3+} .¹⁰²

Vielma (2004) mostró el efecto positivo de la suplementación de fitasas en la digestibilidad de proteínas. Para ello, realizó dos ensayos de digestibilidad y dos ensayos de crecimiento

para evaluar la influencia del uso de fitasa rociada en el alimento sobre el coeficiente de digestibilidad aparente de proteína y minerales en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* alimentada con dietas a base de harina de soya. Claramente, la fitasa redujo el contenido de ácido fítico en las heces de 35 a 5 mg de ácido fítico/g de materia seca en heces. El coeficiente de digestibilidad aparente de fósforo aumentó de 23% a 83%. La proteína aparente aumentó 1.2% y 3.2% U de fitasa. La fitasa no aumentó la utilización de lisina, ya que ni la retención de proteína ni la ganancia de peso fueron mejoradas por la enzima.¹⁰³

El empleo de fitasas en preparaciones nutrimentales para camarón ofrece una alternativa para resolver los efectos anti-nutricionales de los fitatos presentes en las harinas vegetales. Davis y Arnold (1998) evaluaron la capacidad de la enzima fitasa para liberar el P^{3+} unido al fitato. Para ello, utilizaron una dieta deficiente en P^{3+} y otra dieta alta en P^{3+} , a la que adicionalmente se le suplementó la enzima fitasa; ambas dietas se experimentaron en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Al término del experimento se evaluó la biomasa final, porcentaje de peso ganado y la conversión alimenticia. La supervivencia y ganancia de peso de los camarones alimentados con la dieta basal fue menor en comparación a los animales alimentados con la dieta hecha a base de fitasa.⁶⁰

Buchanan *et al.* (1997) experimentaron con enzimas en harina de canola en dietas para camarón negro *Penaeus monodon*, a fin de analizar el aumento de peso y coeficiente de conversión alimenticia. Fueron preparadas cinco dietas diferentes: (1) dieta basada en harina de calamar sin canola, (2) dieta basal + 20% de canola (dieta baja en canola), (3) poca cantidad de canola + 0.25% de mezcla de enzimas (Porzyme[®], Finnfeeds International[®]), (4) dieta basal + 64% de canola (dieta alta en canola), (5) alta cantidad de canola + 0.25% de mezcla de enzimas o dieta basal + 54% de canola + 10% de sucrosa. La

dieta alta en canola dio resultados significativamente bajos en cuanto a índices de crecimiento y la adición de enzimas aumentó la ganancia de peso en un 28% a un nivel similar a la dieta. La dieta baja en canola y la dieta hecha a base de enzimas registraron altos índices de ganancia de peso, en comparación con la dieta basal y la dieta con poca cantidad de canola; sin embargo, no fue significativo. La adición de la mezcla de enzimas a las dietas dio un resultado significativo en cuanto al Coeficiente de Conversión Alimenticia.¹⁰⁰

Ricque-Marie, *et al* (2004) midieron el efecto de una fitasa comercial (*Allzyme*[®]) en la digestibilidad aparente de materia seca, digestibilidad de proteína cruda y digestibilidad de fósforo en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, alimentados con una dieta que contenía 40% de fuente de fósforo ligada al fitato. La digestibilidad aparente de materia seca y proteína del polvo de chícharo con y sin fitasa, fueron determinadas en dietas experimentales donde la fuente de fósforo ligada al fitato sustituyó un 40% de la fórmula completa de una dieta de referencia. El efecto positivo de la fitasa sobre la Digestibilidad Aparente de Materia Seca y Proteína pudo deberse a la presencia de actividad enzimática. Este estudio demostró que futuras investigaciones para determinar digestibilidad de fósforo en ingredientes vegetales deben incluir fitasa como suplemento para generar datos sobre el uso moderado de P^{3+} inorgánico suplementado usado en acuicultura.¹⁰⁴

Digestibilidad en camarones

Smith *et al.* (1985) estudiaron el crecimiento, supervivencia y digestibilidad en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* en tres experimentos diferentes. Se usaron tres dietas con contenido de proteína vegetal de 22, 29 y 36% y una dieta con fuente de proteína animal. El crecimiento (g/día) disminuyó significativamente con el aumento de talla de los camarones, mientras que la digestibilidad varió independientemente de la talla. La digestibilidad de proteína en camarones de talla pequeña fue fuertemente correlacionada con el nivel de proteína en la dieta. Solo los camarones de talla pequeña mostraron una fuerte correlación entre la digestibilidad de proteína y el crecimiento.⁸²

Lee *et al.* (1985) investigaron la relación entre el nivel de proteína, tamaño, digestibilidad aparente del alimento, actividad de enzimas digestivas y crecimiento en el camarón blanco norteamericano *Penaeus setiferus*, durante 30 días. Las proteasas totales y proteasas ácidas, y la actividad de tripsina, carboxipeptidasa A y B, α -amilasa, quitinasa estereasa no específica y lipasa también fueron determinadas. La supervivencia no se relacionó con la dieta o el tamaño. El índice de crecimiento; la digestibilidad aparente de materia seca y proteína disminuyeron conforme los animales crecían. Los camarones pequeños alimentados con una dieta del 22% de proteína crecieron poco, pero tuvieron la actividad enzimática más alta, especialmente las carbohidrasas. Los camarones pequeños alimentados con una dieta del 38% de proteína mostraron la digestibilidad de materia seca más alta. Por lo tanto, estos autores concluyeron que la actividad de enzimas digestivas en la dieta de 22% de proteína pudo ser evidencia de que conforme aumenta el porcentaje de inclusión de la proteína, disminuye la actividad enzimática de los organismos.¹⁰⁵

Akiyama (1989) trabajó con harina de soya como sustituto de harina de camarón para procesos comerciales en una fábrica de alimentos en Taiwan para el camarón negro *Penaeus monodon*. Para esto utilizó 5 alimentos extrudizados a bajas temperaturas (90°C), cuatro tipos de alimento contenían 20%, 30%, 40% y 50% de harina de soya con reducción de niveles de harina de pescado de 18%, 12%, 6% y 0%, respectivamente. El quinto alimento fue un control. Todas las dietas contenían porcentajes similares de proteína, grasas, fibra, cenizas, Ca^{2+} , P^{3+} y K^{1+} , los cuales fueron mantenidos a 43.0%, 5.7%, 3.0%, 15.5%, 2.7%, 2.0% y 1.4%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas estadísticamente en cuanto a porcentaje de ganancia de peso, porcentaje de sobrevivencia y en los factores de conversión alimenticia. Se pudo demostrar con estos resultados, que la harina de soya puede reemplazar una cantidad considerable de harina de pescado blanco, si los parámetros nutricionales se mantienen.¹⁰⁶

Posteriormente, Akiyama (1991) vuelve a experimentar con harina de soya para alimentación de camarón, reportando que la digestibilidad de la harina de soya es alta, especialmente los aminoácidos de las proteínas y la diferencia de digestibilidad parece ser pequeña en las tres especies de camarón con las que se probó: camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, camarón negro *Penaeus monodon* y el camarón tigre *Penaeus japonicus*. Cuando se desea reemplazar la harina animal por harina de soya, se debe considerar no sólo el contenido proteico, sino también los ácidos grasos, los minerales y otros nutrientes, los cuales están presentes en harina animal y no en harina de soya.¹⁰⁷

Cruz-Suárez *et al.* (2009), evaluaron la digestibilidad aparente de materia seca, energía y proteína en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, utilizando cuatro dietas de prueba hechas a base de harina de soya en diferentes porcentajes y una dieta de

referencia hecha a base de harina de pescado, y como marcador inerte el óxido de cromo. En general, la digestibilidad aparente de materia seca, de energía y proteína fueron mayores en las dietas con harina de soya, en comparación a la dieta de referencia.¹⁰⁸

Estudio sobre enzimas digestivas en el camarón

Investigaciones recientes sobre los procesos digestivos en camarones peneidos han sido enfocadas a la evaluación de la habilidad del organismo para hidrolizar, absorber y asimilar los nutrientes de la dieta.¹⁰⁹ En esas investigaciones, el estudio de las enzimas digestivas es un paso esencial para entender el mecanismo de digestión y tener un mejor conocimiento de las necesidades nutricionales del animal.¹¹⁰

La digestión de proteína en crustáceos es específica, no presenta digestión enzimática en estómago ni desnaturalización ácida.⁹⁴ Hay autores que señalan que las enzimas producidas por la flora del tubo digestivo se encuentran involucradas en la digestión del alimento. Por ejemplo, Hood y Meyers (1989) encontraron bacterias productoras de quitinasa, aisladas en el camarón blanco nortero *Penaeus setiferus*. Debido al poco tiempo de tránsito del alimento en el tracto digestivo, la contribución de enzimas de la flora parece ser muy limitada.⁹⁶

Se piensa que la actividad enzimática y el crecimiento podría estar influenciada por el ritmo circadiano y ciclo de muda de los camarones. Molina *et al.* (2000) encontraron que la mayor actividad específica de α -amilasa se presentó en los estadios de pre-muda inicial D0 y D2, y la menor en pre-muda D3 durante el ciclo de muda. Mientras que para las proteasas en los estadios de post-muda final B, intermuda C y premuda inicial D0 se encontró la

mayor actividad, coincidiendo con la etapa donde el camarón consume 18% de más alimento. En cuanto al ritmo circadiano encontraron que los camarones alimentados entre las 12:00 h– 20:00 h produjeron la mayor actividad específica de proteasa, α -amilasa y lipasa con un pico máximo a las 14:00 h y uno segundo de menor intensidad a las 02:00 h.¹¹¹

Un factor que podría inhibir la actividad enzimática es la presencia de ácido fítico en las dietas. Las enzimas que se ven afectadas por este factor anti-nutricional presente en las dietas son α -amilasa,^{112,113} lipasas¹¹² y proteinasas,^{114,113} tales como la pepsina, tripsina y quimotripsina. El efecto inhibitorio aumenta con el número de residuos de fosfato por molécula de mio-inositol y la concentración de fosfato de mio-inositol. Esta inhibición puede deberse a la naturaleza inespecífica de las interacciones proteína-fitato, la quelación de iones de Ca^{+2} que son esenciales para la actividad de la tripsina y α -amilasa o la interacción con los sustratos de estas enzimas. La inhibición de proteasas puede deberse en parte a la reducción de la digestibilidad de proteína que el fitato podría llegar a provocar.¹¹⁵

JUSTIFICACIÓN

Ya que el camarón requiere de alimentos ricos en proteína y ésta es el ingrediente más caro, es necesario hacer un enfoque racional para identificar y seleccionar las fuentes de proteína para que el costo de elaboración del alimento sea menor. Durante muchos años, la harina de pescado ha sido utilizada como fuente de proteína animal. Sin embargo, a causa de las limitantes que presenta este ingrediente en cuanto a costo, disponibilidad y a nivel nutricional, hoy en día se pretende buscar opciones que permitan reemplazar la harina de pescado por otra fuente de proteína. Por ello, se puede considerar el uso de fuentes de proteína vegetal; y aunque es verdad que el camarón es un animal omnívoro con preferencias carnívoras, existen evidencias que respaldan que estos animales también consumen restos vegetales en menor proporción cuando se encuentran en vida libre.

En este caso, es la harina de soya la que en los últimos años ha adquirido una gran importancia como ingrediente rico en proteína, y aunque presenta factores anti-nutricionales (entre ellos el ácido fítico) se pueden suplementar las dietas con enzimas exógenas que permitan la degradación de esos factores anti-nutricionales o los reviertan, mejorando así la digestibilidad de los componentes de la dieta, principalmente de P^{3+} .

HIPÓTESIS

Si la enzima fitasa hidroliza al ácido fítico presente en las fuentes de proteína vegetal, entonces una dieta hecha con pasta de soya y canola pre-tratadas con esta enzima, evitará la formación de complejos entre el ácido fítico, minerales y proteínas, mejorando la absorción de nutrientes, la digestibilidad de P^{3+} y el crecimiento de juveniles de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum*.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Comparar el efecto de la enzima fitasa sobre proteínas vegetales contenidas en dietas para engorda de juveniles cultivados del camarón rosado del Golfo de México, *Farfantepenaeus duorarum*.

2. Objetivos particulares

- Determinar los valores de digestibilidad aparente de fósforo total, proteína y materia seca de las dietas pre-tratadas con la enzima fitasa en juveniles cultivados del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum*.
- Evaluar el efecto de las fuentes de proteína vegetal sobre la fisiología enzimática de juveniles cultivados del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* (tripsina, quimiotripsina, proteasas totales, α -amilasa, glucosidas, leucin amino-peptidasa y carboxipeptidasa B).
- Evaluar el efecto del pre-tratamiento de las fuentes vegetales contenidas en las dietas experimentales con respecto a:
 - 1) El crecimiento.
 - 2) La supervivencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Origen de los animales

Fueron utilizados 63 camarones del área de Estanquería de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal, Yucatán (Figura 6), identificados como la F1 obtenida de un grupo de camarones que fueron capturados en la Sonda de Campeche para ser mantenidos bajo condiciones de laboratorio, con el objetivo de reproducirlos. Los animales tomados para el experimento tenían un peso promedio inicial de 11.46 g, mismos que estaban bajo la técnica de cultivo Bio-Floc de acuerdo con la metodología propuesta por Emerenciano *et al.*¹¹⁶ y eran alimentados con una dieta comercial (Malta Cleyton[®]) con un 35% de proteína.



Figura 6. Área de Estanquería.

2. Dispositivo experimental

Se usaron 9 estanques con capacidad de 400 L c/u, con sistema de recirculación de agua cerrado, recambio continuo y aireación. El sistema de recirculación tenía tres filtros de 30, 10 y 5 μ , un filtro biológico, un filtro de arena y un espumador. La temperatura del agua se mantuvo en 28°C con ayuda de un Schiller marca Acuabone® y se tuvo un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Figura 7 y 8).

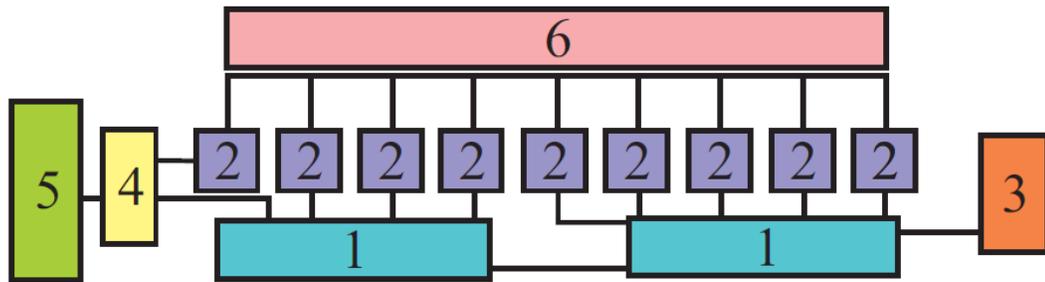


Figura 7. Diagrama del dispositivo experimental. (1) Reservorios de agua, (2) Estanques, (3) Desfragmentador de materia orgánica (espumador), (4) Filtro de arena, (5) Schiller, (6) Distribución de agua a los estanques.



Figura 8. Dispositivo experimental.

3. Diseño experimental y dietas

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con tres tratamientos y tres réplicas para cada uno de ellos. Se sembraron 7 organismos/estanque, con un peso promedio de 11.46 ± 0.09 g.

A cada tratamiento se le asignó una dieta:

- Tratamiento 1: Control.
- Tratamiento 2: Dieta con enzima fitasa de uso comercial (Ronozyme[®] P500).
- Tratamiento 3: Dieta con enzima fitasa de origen microbiano (FTE II).

Las dietas fueron fabricadas en el laboratorio de nutrición de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación-Sisal, siguiendo el protocolo de elaboración de una dieta

artificial para camarón de dicha Unidad (Cuadro 3), que consistió en una molienda y tamizado de materias primas que fueron llevadas al mismo tamaño de partícula (250 μ) para poder homogenizarla en la mezcladora en un lapso de 10 minutos, en este tiempo se fue adicionando poco a poco la zeolita. Posteriormente, se añadieron los aceites y el aglutinante permitiendo que se mezclaran durante 10 minutos más y se formara la pasta que fue peletizada para poder secarse a 60°C durante 12 h.

Cuadro 3.

COMPOSICIÓN DE DIETAS PARA CAMARÓN ROSADO DEL GOLFO DE MÉXICO *Farfantepenaeus duorarum*

Materias primas g/100 g	Dieta Control	Dieta RONOZYME® P5000	Dieta FTE II
Ensilado de mero	5	5	5
Concentrado proteico de soya	32	32	32
Pasta de soya	10	10	10
Pasta de canola	24,5	24,5	24,5
Harina de trigo	19	18,8	19
Aceite de hígado de bacalao	4	4	4
Lecitina de soya	1	1	1
Colesterol	0,5	0,5	0,5
Vit-min (DSM)	1,5	1,5	1,5
Ronozyme®	0	0,05	0
Carboximetilcelulosa	1	1	1
Zeolita	1,5	1,5	1,5
Relleno	0	0,15	0
Total	100	100	100

Las harinas (soya y canola) de la dieta FTE II fueron pre-tratadas con una enzima fitasa recombinante producida por la levadura *Pichia pastoris* (actividad de 543 U/mL, rango de pH de 5.5 a 9 y temperatura de 45°C a 70°C). A continuación, las harinas se incubaron durante 15.5 h a 40°C en una relación 1:1.5 (harina: agua) para posteriormente secarlas por

12.5 h a 60°C, con la finalidad de eliminar la humedad y permitir su fácil homogenización con el resto de los ingredientes hasta formar la pasta que después también fue peletizada, como en el caso de la dieta Control y dieta Ronozyme[®] P5000.

Durante los 60 días del experimento, los animales fueron alimentados 5 veces al día (una toma cada hora) con el 10% de su biomasa. Además, se colectaron las heces de cada uno de los casetones. Diariamente, previo a cada nueva alimentación, se retiraban los restos de alimento no consumido y heces mediante sifoneo (Figura 9), empleando un filtro de papel de 400 mm; posteriormente, las heces colectadas se lavaron con agua destilada para eliminar las sales, y se pusieron a secar a 60°C hasta lograr peso constante, para luego ser pesadas y usadas para su posterior análisis.



Figura 9. Colecta de heces.

4. Parámetros evaluados

4.1 Digestibilidad aparente de fósforo total

Para realizar la digestión y liberación de P^{3+} en las muestras de dietas y heces se siguió la técnica establecida por Taussky y Shorr¹¹⁷ y el método oficial de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995):¹¹⁸

$$\text{Fósforo, g/100 g} = 100 \times [(V_2/V_1) \times P]/W$$

donde:

V_1 = volumen de la solución usada para formar la reacción de color, mL

V_2 = volumen del matraz volumétrico que contiene la muestra de cenizas, 100 mL

P = cantidad de fósforo correspondiente a la absorbancia obtenida de la muestra, mg

W = peso de la cantidad de muestra, mg

Al tener la concentración de P^{3+} por muestra, se aplicó la siguiente fórmula para conocer la Digestibilidad aparente de fósforo total en dietas y heces:

$$\%DAPT = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en dieta}/\% \text{ zeolita en heces}) (\% \text{ fósforo en heces}/\% \text{ fósforo en dieta}))$$

4.2 Digestibilidad aparente de materia seca

Para el análisis de la digestibilidad de materia seca se usó la técnica de Cenizas Insolubles en Ácido (AIA), usando como marcador la zeolita,¹¹⁹ la cual fue medida en cada una de las

dietas y en heces. La fórmula empleada para calcular digestibilidad aparente de materia seca¹²⁰ es la siguiente:

$$\%DAMS = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en la dieta} / \% \text{ zeolita en las heces}))$$

4.3 Digestibilidad aparente de proteína

Se enviaron al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) 250 mg de muestra de cada dieta y de heces por estanque, las cuales fueron evaluadas mediante el método Kjeldahl, el cual tiene como objetivo determinar la concentración de nitrógeno presente en la muestra a tratar para luego ser transformado a través de un factor en proteína. Una vez que se recibieron los resultados se aplicó la siguiente fórmula para determinar su digestibilidad:

$$\%DAP = 100 \times (1 - (\% \text{ zeolita en el alimento} / \% \text{ zeolita en heces})) \times (\% \text{ proteína en heces} / \% \text{ proteína en el alimento}).$$

4.4 Actividad enzimática

Se colectaron de cada tratamiento cinco hepatopáncreas del estadio de post-muda inicial A, post-muda final B1, pre-muda inicial D0, D1' y D1''.

La actividad de la tripsina se determinó en las diluciones 1:10 utilizando como sustrato Benzoil-Arginine Paranitro Anilide (BAPNA) 100 mM en buffer TRIS 0.1 M, pH 8.

La actividad de la quimotripsina se midió en la dilución 1:10 utilizando como sustrato Succinil-Alanina₂-Proline-Phenil-Pnitroanilide (SAPPNA) 100 mM en buffer TRIS 0.1 M, pH 8.

Para la determinación de las proteasas totales se usó el método de Todd,¹²¹ utilizando como sustrato Azo dye-impregnated collagen 2.4% (Azocoll) en buffer sodio fosfato 10 mM, pH 7 y TCA al 5% como reactivo, en la dilución 1:10.

La α -amilasa se midió en la dilución 1:10 utilizando glucógeno Ostra al 1% como sustrato en buffer sodio fosfato 10 mM pH 7 y como reactivo ácido dinitrosalicílico (DSA) en dimethylsulfoxido (DMSO).

Para determinar glucosidasa se midió en la dilución 1:10 usando como sustrato p-Nitrofenil- α -D-GlucoPiranoside (PNPG) 100 mM con buffer sodio fosfato 50 mM pH 6 y como reactivo carbonato de sodio 1 M.

La leucin amino-peptidasa se midió a una dilución 1:10 y se determinó usando como sustrato L-Leucine-p-nitroanilide (LPNA) 100 mM usando como buffer TRIS 0.1 M pH 8.

Para determinar carboxipeptidasa B se usó una dilución 1:10, usando como sustrato Hippuryl-L-Arg (HLA) y como buffer TRIS 25 mM con NaCl 0.1 M pH 8.

4.5 Variables físico-químicas

El oxígeno y la temperatura se analizaron con un oxímetro marca HACH modelo HQ40d, la salinidad se analizó con un refractómetro Vitalsine SR-6. Los tres parámetros se midieron dos veces al día (8:00 am y 4:00 pm).

4.6 Crecimiento

Se determinó por medio del Coeficiente Diario de Crecimiento¹²² en %/mg/día⁻¹ (con una balanza marca Explorer). La fórmula para calcularlo es la siguiente:

$$\text{CDC} = (\text{Peso final}^{1/3} - \text{Peso inicial}^{1/3}) / \text{no. de días} * 100$$

4.7 Supervivencia

Se determinó a partir de la diferencia entre los organismos sembrados al inicio y al final del experimento:

$$\text{Tasa de supervivencia} = (\text{Número final} / \text{Número inicial}) * 100$$

5. Análisis estadísticos

Dado el diseño experimental completamente aleatorizado, se aplicará el análisis de varianza bifactorial para evaluar si el factor dieta o el factor muda afectaron significativamente los tratamientos. Posteriormente, se aplicará el análisis de varianza de una vía para evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos, verificando que se cumplan los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Si se detectan diferencias significativas, se realizarán pruebas de ponderación de las medias (Tukey). En todos los casos se empleará un nivel de probabilidad de 0.05. El paquete utilizado será STATISTICA[®] 7.

RESULTADOS

1. Coeficiente de digestibilidad aparente

El ANOVA de una vía aplicado a los valores del coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca, fósforo y proteína presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4.

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD APARENTE EN MATERIA SECA, FÓSFORO Y PROTEÍNA DE LA DIETA CONTROL, RONOZYME® P5000 Y FTE II

Dieta	CDA Materia seca (%)	CDA Fósforo (%)	CDA Proteína (%)
Control	76.01±3.63 ^a	50.84±8.45 ^a	93.16±1.03 ^a
Ronozyme® P5000	87.41±1.47^b	86.30±2.42^b	96.05±0.46^b
FTE II	79.69±1.52^a	89.53±3.45^b	95.02±0.37^b

Superíndices distintos indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

El CDA en materia seca evaluado señaló diferencias significativas (p<0.05), obteniendo el valor más alto en la dieta **Ronozyme® P5000 (87.41±1.47)** que superó a la dieta Control (76.01±3.63) y FTE II (79.69±1.52) que presentaron los valores más bajos.

En cuanto al CDA en P³⁺ se obtuvieron diferencias significativas (p<0.05), obteniendo los mejores valores en la dieta **Ronozyme® P5000 (86.30±2.42)** y **FTE II (89.53±3.45)** que superaron a la dieta Control (50.84±8.45) que presentó los valores más bajos.

Lo mismo sucedió en el CDA de proteína, donde se observaron diferencias significativas entre las dietas, teniendo los valores más altos en la dieta **Ronozyme® P5000 (96.05±0.46)** y **FTE II (95.02±0.37)** en comparación con la dieta Control (93.16±1.03).

2. Actividad enzimática

2.1 Actividad de la tripsina

En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de la tripsina de acuerdo a las dietas y el estadio de muda de los organismos.

Cuadro 5.						
ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA TRIPSINA						
	A	B1	D0	D1'	D1'''	D2
Control	4.17±0.21 ^a	4.89±1.28 ^a	3.62±0.89 ^a	4.24±1.05 ^a	1.28 ^{a*}	5.01 ^{a*}
Ronozyme® P5000	0.63±0.20 ^b	1.04±0.26 ^b	1.84 ^{b*}	1.19±0.38 ^b	2.45±2.29 ^b	0.81 ^{b*}
FTE II	5.53 ^{b*}	2.33±0.87 ^b	1.61±0.54 ^b	1.15±0.12 ^b	2.07±1.21 ^b	1.27 ^{b*}

Los resultados se muestran en U/g de tejido de hepatopáncreas.

*Valor único.

Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

En el Cuadro 6 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de la tripsina resultó afectada significativamente para el factor dieta ($p < 0.05$).

Cuadro 6.	
ANOVA BIFACTORIAL DE LA TRIPSINA ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA	
EFECTO	p
DIETA	0.005491
MUDA	0.746753
DIETA*MUDA	0.440982

En el Cuadro 7 se observa que la actividad significativamente más elevada se obtuvo en la dieta **Control (3.96±0.47) (p<0.05)**, mientras que la dieta Ronozyme[®] P5000 (1.25±0.29) y FTE II (1.99±0.39) no mostraron diferencias significativas (p>0.05).

Cuadro 7.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA POR DIETAS

DIETA	PROMEDIO
Control	3.960301^a
Ronozyme [®] P5000	1.259639 ^b
FTE II	1.992274 ^b

Superíndices indican diferencias significativas (p<0.05).

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 10, donde se observan las diferencias significativas entre las dietas.

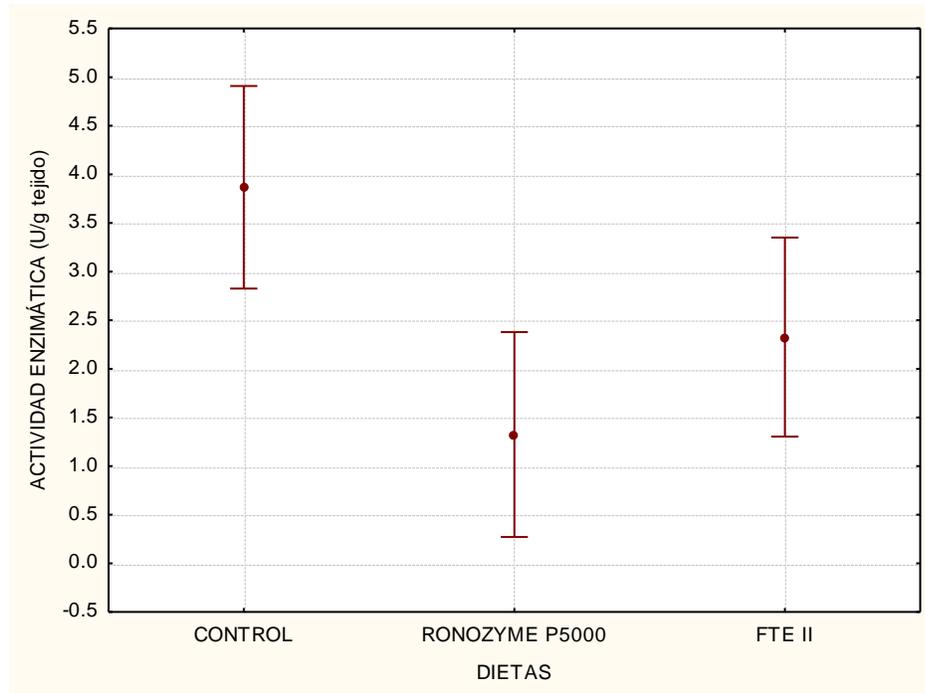


Figura 10. Actividad de la tripsina entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

2.2 Actividad de la quimotripsina

En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de la quimotripsina de acuerdo a las dietas y estadio de muda de los organismos.

Cuadro 8.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA QUIMOTRIPSINA						
	A	B1	D0	D1'	D1''	D2
Control	4.70±1.26 ^a	6.13±3.71 ^a	8.32±1.29 ^a	7.63±1.33 ^a	0.99 ^a *	10.11 ^a *
Ronozyme® P5000	1.42±0.18 ^b	2.43±0.75 ^b	5.61 ^b *	1.75±0.52 ^b	1.23 ^b *	1.30 ^b *
FTE II	9.78 ^b *	2.59±0.70 ^b	3.10±0.54 ^b	1.77±0.20 ^b	3.50±1.91 ^b	3.66 ^b *

Los resultados se muestran en U/g de tejido de hepatopáncreas.

*Valor único

Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

En el Cuadro 9 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de la quimotripsina resultó afectada significativamente para el factor dieta (p<0.05).

Cuadro 9.

ANOVA BIFACTORIAL DE LA QUIMOTRIPSINA ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA	
EFFECTO	p
DIETA	0.003109
MUDA	0.182280
DIETA*MUDA	0.068959

En el Cuadro 10 se observa que la actividad significativamente más elevada se obtuvo en la dieta **Control (7.11±0.82) (p<0.05)**, mientras que la dieta Ronozyme® P5000 (2.11±0.39) y FTE II (3.29±0.61) no mostraron diferencias significativas (p>0.05).

Cuadro 10.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LA QUIMOTRIPSINA POR DIETAS

DIETA	PROMEDIO
Control	7.113954^a
Ronozyme [®] P5000	2.111093 ^b
FTE II	3.298385 ^b

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 11, donde se observan las diferencias significativas entre las dietas.

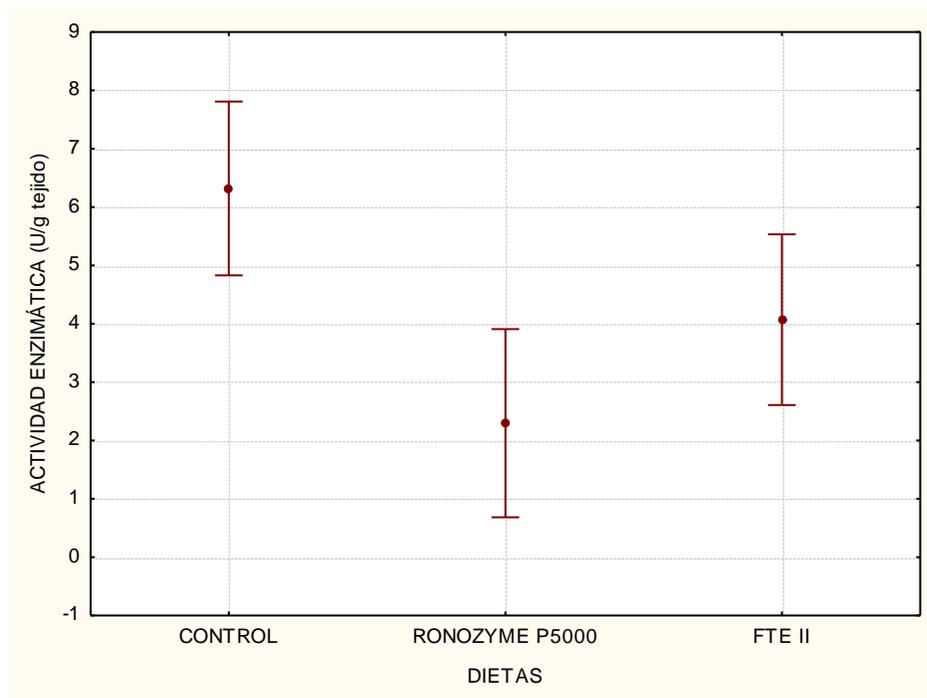


Figura 11. Actividad de la quimotripsina entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

2.3 Actividad de proteasas totales

En el Cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de las proteasas totales de acuerdo a las dietas y estadio de muda de los organismos.

Cuadro 11.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS PROTEASAS TOTALES

	A	B1	D0	D1'	D1''	D2
A	1615.55±348.84 ^a	1418.13±259.97 ^a	1923.70±192.74 ^a	1683.34±320.55 ^a	2055.02 ^{a*}	2142.09 ^{a*}
B	954.43±39.12 ^b	1137.42±188.54 ^b	918.68 ^{b*}	1596.21±117.74 ^b	958.73±52.38 ^b	1835.31 ^{b*}
C	1196.86 ^{ab*}	1568.23±37.59 ^{ab}	954.92±157.34 ^{ab}	1963.06±507.91 ^{ab}	1430.92±180.15 ^{ab}	1093.29 ^{ab*}

(A) Dieta Control, (B) Dieta Ronozyme[®] P5000 y (C) Dieta FTE II.

Los resultados se muestran en U/g de tejido de hepatopáncreas.

*Valor único.

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el Cuadro 12 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de las proteasas totales resultó afectada significativamente para el factor dieta ($p < 0.05$).

Cuadro 12.

**ANOVA BIFACTORIAL DE LAS PROTEASAS TOTALES
ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA**

EFEECTO	p
DIETA	0.021651
MUDA	0.226730
DIETA*MUDA	0.270490

En el Cuadro 13 se observa que la actividad significativamente más elevada se obtuvo en la dieta **Control (1777.85±124.87) ($p < 0.05$)**, seguida de la dieta Ronozyme[®] P5000

(1274.07±101.19), mientras que la dieta FTE II (1399.76±138.26) no mostró diferencias significativas ($p>0.05$).

Cuadro 13.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS TOTALES POR DIETAS

DIETA	PROMEDIO
Control	1777.850 ^a
Ronozyme [®] P5000	1274.074 ^b
FTE II	1399.768 ^{a,b}

Superíndices indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 12, donde se observan las diferencias significativas entre las dietas.

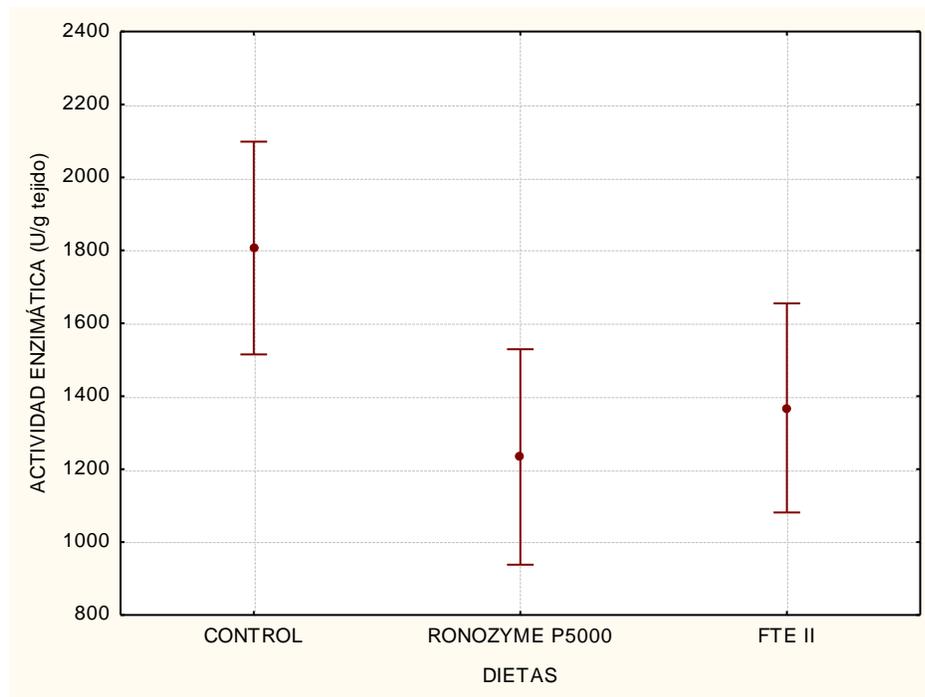


Figura 12. Actividad de las proteasas totales del experimento entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

2.4 Actividad de la glucosidasa

En el Cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de la glucosidasa de acuerdo a las dietas y estadio de muda de los organismos.

Cuadro 14.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA GLUCOSIDASA						
	A	B1	D0	D1'	D1'''	D2
Control	53.83±20.77	85.63±67.44	40.35±7.22	60.62±19.91	17.11*	77.76*
Ronozyme®	18.75±12.61	14.83±7.35	58.37*	24.32±10.88	96.94*	11.08*
P5000						
FTE II	60.92*	46.61±24.82	25.16±6.38	17.77±1.99	35.99±21.80	40.70*

Los resultados se muestran en U/g de tejido del hepatopáncreas.

*Valor único.

En el Cuadro 15 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de la glucosidasa no resultó afectada significativamente ni para el factor dieta, ni para los estadios de muda ($p > 0.05$).

Cuadro 15.

ANOVA BIFACTORIAL DE LA GLUCOSIDASA ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA	
EFECTO	p
DIETA	0.376164
MUDA	0.922684
DIETA*MUDA	0.317557

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 13, donde no se observan diferencias significativas entre las dietas y estadios de muda.

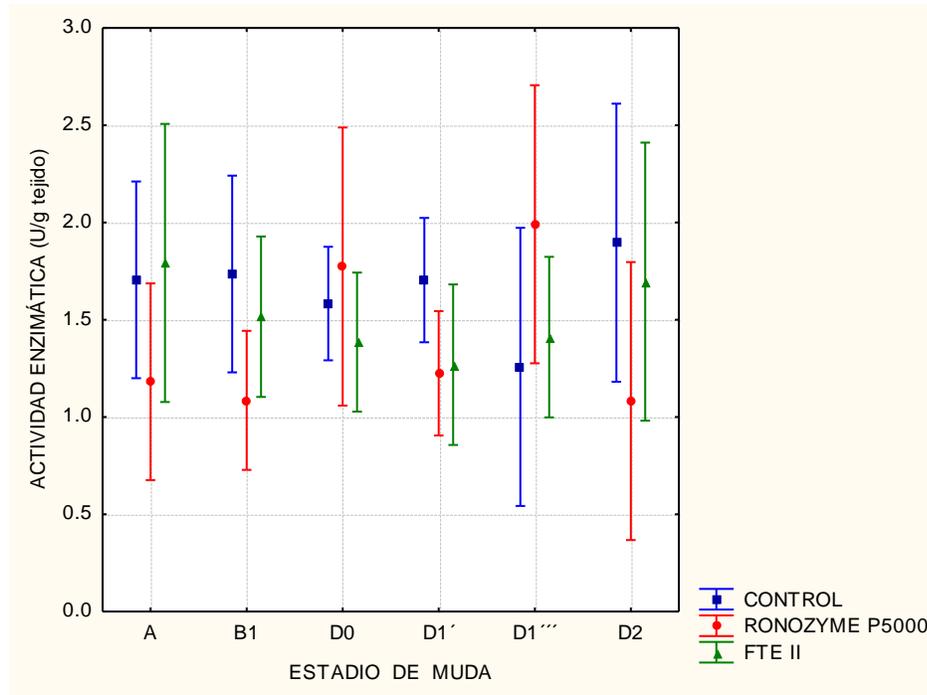


Figura 13. Actividad de la glucosidasa entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

2.5 Actividad de la α -amilasa

En el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de la α -amilasa de acuerdo a las dietas y estadio de muda de los organismos.

Cuadro 16.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA α -AMILASA						
	A	B1	D0	D1'	D1'''	D2
CONTROL	563.92±21.91	573.02±107.98	521.33±73.92	566.20±68.74	335.88*	454.84*
RONOZYME[®] P5000	215.88±17.29	346.89±37.76	465.75*	289.05±34.82	373.74±43.20	288.99*
FTE II	765.23*	458.63±139.09	405.30±73.97	304.67±16.64	443.24±233.81	415.87*

Los resultados se muestran en U/g de tejido de hepatopáncreas.

*Valor único

En el Cuadro 17 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de la α -amilasa no resultó afectada significativamente ni para el factor dieta, ni para los estadios de muda ($p>0.05$).

Cuadro 17.

**ANOVA BIFACTORIAL DE LA α -AMILASA
ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA**

EFEECTO	p
DIETA	0.065256
MUDA	0.704184
DIETA*MUDA	0.582953

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 14, donde no se observan diferencias significativas entre las dietas y estadios de muda.

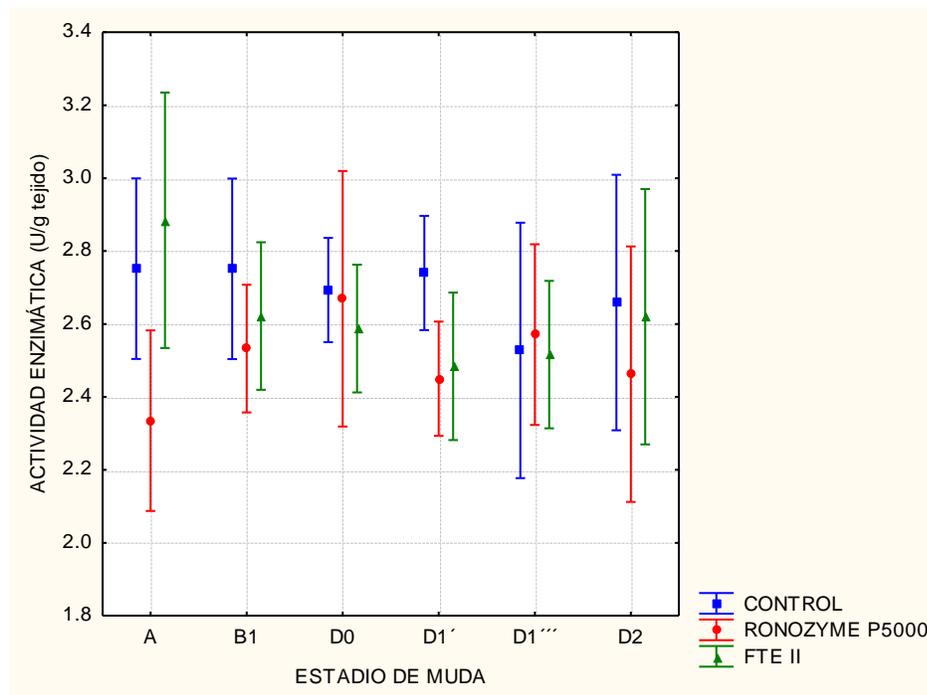


Figura 14. Actividad de la α -amilasa entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

2.6 Actividad de la leucin amino-peptidasa

En el Cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de la leucin amino-peptidasa de acuerdo a las dietas y estadio de muda de los organismos.

Cuadro 18.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA LEUCIN AMINO-PEPTIDASA

	A	B1	D0	D1'	D1'''	D2
CONTROL	1.72±1.36	2.42±0.53	1.14±0.20	1.17±0.35	0.94*	1.06*
RONOZYME®	0.46±0.40	0.75±0.23	0.99*	0.79±0.38	1.42±0.20	0.52*
P5000						
FTE II	1.45*	1.31±0.44	1.52±0.64	0.94±0.37	0.84±0.26	0.83*

Los resultados se muestran en U/g de tejido de hepatopáncreas.

*Valor único.

En el Cuadro 19 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de la leucin amino-peptidasa no resultó afectada significativamente ni para el factor dieta, ni para los estadios de muda ($p > 0.05$).

Cuadro 19.

ANOVA BIFACTORIAL DE LA LEUCIN AMINO-PEPTIDASA ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA

EFEECTO	p
DIETA	0.274457
MUDA	0.740942
DIETA*MUDA	0.752804

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 15, donde no se observan diferencias significativas entre las dietas y estadios de muda.

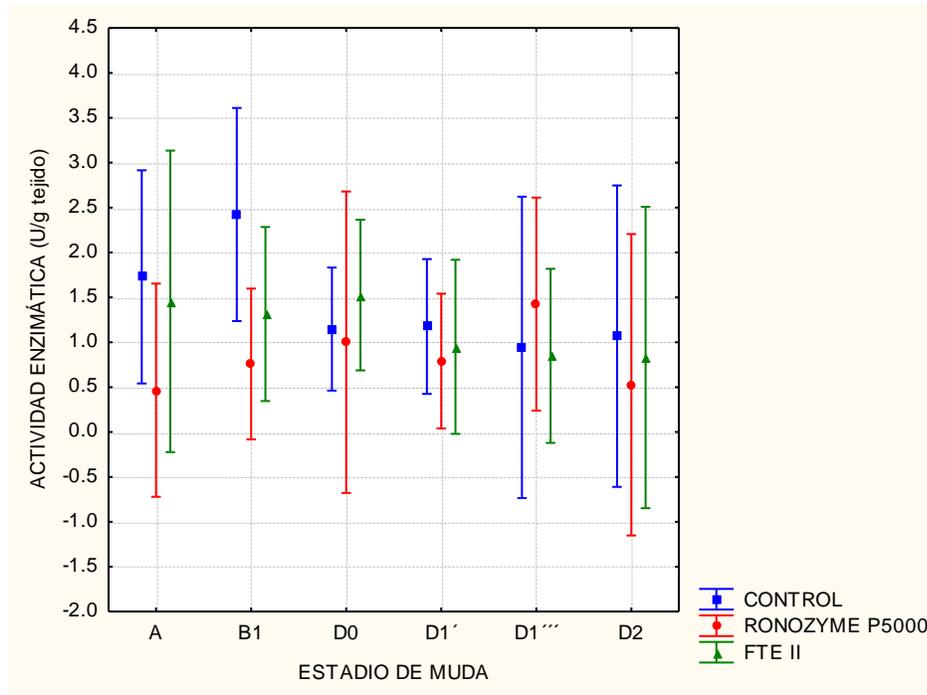


Figura 15. Actividad de la leucin amino-peptidasa entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

2.7 Actividad de la carboxipeptidasa B

En el Cuadro 20 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica de la carboxipeptidasa B de acuerdo a las dietas y estadio de muda de los organismos.

Cuadro 20.
ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CARBOXIPETIDASA B

	A	B1	D0	D1'	D1''	D2
A	0.4854±0.0273 ^b	0.8117±0.0632 ^b	0.5219±0.0590 ^b	0.5167±0.0713 ^b	0.2196 ^b *	0.5506 ^b *
B	0.7402±0.4438 ^a	1.0536±0.1123 ^a	1.1461 ^a *	0.6361±0.1244 ^a	0.7682±0.0380 ^a	0.8613 ^a *
C	0.5329 ^{ab} *	0.6289±0.0270 ^{ab}	0.7121±0.1146 ^{ab}	0.6010±0.1511 ^{ab}	0.6314±0.0425 ^{ab}	0.8069 ^{ab} *

(A) Dieta Control, (B) Dieta Ronozyme[®] P5000, (C) Dieta FTE II.

Los resultados se muestran en U/g de tejido de hepatopáncreas.

*Valor único.

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el Cuadro 21 se observa que el ANOVA bifactorial demostró que la actividad de las proteasas totales resultó afectada significativamente para el factor dieta ($p < 0.05$).

Cuadro 21.

**ANOVA BIFACTORIAL DE LA CARBOXIPEPTIDASA B
ENTRE EL FACTOR DIETA Y EL FACTOR MUDA**

EFEECTO	p
DIETA	0.002914
MUDA	0.069159
DIETA*MUDA	0.571021

En el Cuadro 22 se observa que la actividad significativamente más elevada se obtuvo en la **dieta Ronozyme[®] P5000 (0.841±0.081) ($p < 0.05$)**, seguida de la FTE II (0.651±0.042), mientras que la dieta Control (0.534±0.041) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

Cuadro 22.

**DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE
LA CARBOXIPEPTIDASA B POR DIETAS**

DIETA	PROMEDIO
CONTROL	0.534093 ^b
RONOZYME[®] P5000	0.841686^a
FTE II	0.651534 ^{a,b}

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Esta relación se aprecia claramente en la Figura 16, donde se observan las diferencias significativas entre las dietas.

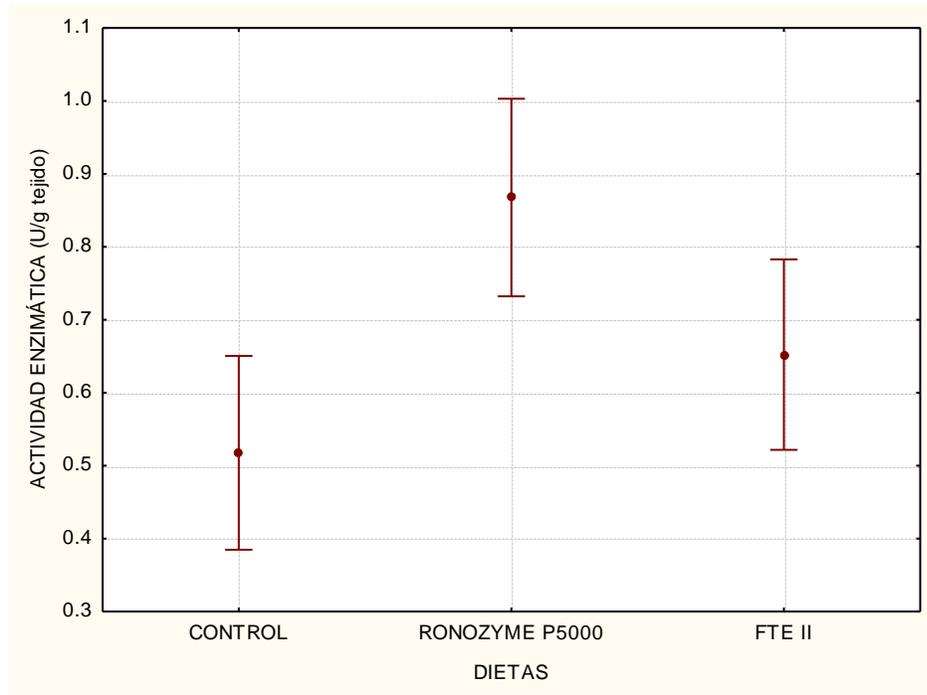


Figura 16. Actividad de carboxipeptidasa B entre la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II.

3. Variables físico-químicas

Durante los 60 días del experimento se llevó un registro diario de los parámetros físico-químicos (Cuadro 23). Los parámetros físico-químicos estuvieron dentro de los rangos óptimos de la especie, estos se mantuvieron estables durante todo el experimento.

Cuadro 23.

**PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS REGISTRADOS
DURANTE EL EXPERIMENTO**

Parámetro	Promedio ± SD	Máximo	Mínimo
Temperatura	26.8±1.05	29.9	25.0
Oxígeno disuelto	6.10±0.26	5.41	6.84
Salinidad	36.5±0.59	38	35

4. Crecimiento y supervivencia

Los parámetros productivos evaluados en el experimento con la dieta Control, Ronozyme[®] P5000 y FTE II se muestran en el Cuadro 24.

Cuadro 24.

COEFICIENTE DIARIO DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

PARÁMETRO	CONTROL	RONOZYME[®] P5000	FTE II
Peso promedio inicial (g)	11.44	11.57	11.37
Peso promedio final (g)	11.82	12.01	12.06
CDC (mg día⁻¹)	0.050 ^a	0.046 ^a	0.135 ^a
Supervivencia (%)	90.48 ^a	100 ^a	80.95 ^a

CDC: Coeficiente Diario de Crecimiento

Superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al coeficiente diario de crecimiento, no se observaron diferencias significativas entre las dietas ($p > 0.05$); sin embargo, la dieta FTE II tiene una cierta tendencia a ser mayor (0.135 mg día⁻¹) con respecto a la dieta Control (0.050 mg día⁻¹) y la dieta Ronozyme[®] P5000 (0.046 mg día⁻¹).

En relación a la supervivencia no se observaron diferencias significativas entre las dietas ($p > 0.05$), siendo la de la dieta Control de 90.48%, la dieta Ronozyme[®] P5000 de 100% y la dieta FTE II de 80.95%.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que el pre-tratamiento de harinas de soya y de canola con fitasas de origen microbiano (FTE II) o la adición de fitasas comerciales durante la elaboración de las dietas (Ronozyme[®] P5000) para juveniles cultivados del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* beneficia la digestibilidad de fósforo, materia seca, proteína y actividad enzimática de los camarones en general, y aunque no se obtienen beneficios significativos en cuanto a crecimiento y supervivencia, tampoco los afecta.

El uso de ingredientes proteicos de origen vegetal tiene validez para ser utilizados en sistemas de cultivo, ya que existen estudios que demuestran que en condiciones de vida libre, los crustáceos también incluyen en su dieta algunos componentes vegetales. Los camarones peneidos son considerados omnívoros o detritívoros. Algunos estudios sobre el contenido estomacal se han hecho en varias especies, por ejemplo, en el camarón negro *Penaeus monodon*, camarón de la India *Penaeus indicus*, camarón del plátano *Penaeus merguensis*, camarón rosado *Metapenaeus dobsoni* y camarón del mediterráneo *Penaeus kerathurus*; en general, se han encontrado pequeños crustáceos, poliquetos, algas y detritus. Se cree que algunas especies son más vegetarianas en la elección de su alimento,¹²³ por ejemplo, los metapeneidos (camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*) en contraste con peneidos,¹²⁴ el camarón negro *Penaeus monodon* en contraste con el camarón tigre *Penaeus japonicus*¹²⁵ y hay una evidencia de que la preferencia por el alimento cambia con la edad.¹²⁴

En el contenido estomacal de juveniles de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* se han encontrado algunos peces, gasterópodos, cangrejos

ermitaños, cangrejos braquiuros y camarones palaemónidos. Otros componentes importantes que también se han encontrado, aunque en menor proporción, han sido bivalvos, con un 15% de volumen, algas calcáreas (8%), restos de plantas (5%), copépodos (3%) y fragmentos de pasto de mar (2%).¹²⁶ En el camarón del plátano *Penaeus merguensis* también se ha estudiado el contenido estomacal y se han encontrado evidencias de restos de vegetación en descomposición, detritus orgánicos y material vegetal recién digerido.¹²⁷

Teniendo como referencia que estos animales también son capaces de consumir materia vegetal, aunque en baja proporción, en el presente trabajo se probó el efecto de dietas hechas con este tipo de fuentes de proteína, sobre la digestibilidad aparente de fósforo total, de proteína, de materia seca, la actividad enzimática, el crecimiento y la supervivencia en el camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* bajo condiciones de laboratorio, abriendo una nueva posibilidad de sustituir las fuentes de proteína animal por las vegetales en condiciones de cultivo.

En el proceso de sustitución de la harina de pescado por otras fuentes de proteína, y en particular por fuentes vegetales, existe toda una serie de experimentos que se han llevado a cabo con juveniles de camarón bajo condiciones de experimentación similares a las aplicadas en este experimento. La utilización de altos porcentajes de harina de pescado incrementa la aportación de P^{3+} al ambiente, debido a los altos valores de este mineral que la harina de pescado posee y que no son aprovechados por los crustáceos. Deben diseñarse mejores dietas para evitar el impacto al medio ambiente que afecta la calidad del agua en la que se desarrollan los organismos.¹²⁸ En este trabajo se fortalece la opción de utilizar fuentes de proteína vegetal pre-tratadas con fitasas microbianas o el uso de fitasas

comerciales añadidas en el alimento, obteniendo muy buenos resultados en cuanto a digestibilidad aparente de fósforo total, de materia seca, de proteína y actividad enzimática.

En la trucha arcoíris se han utilizado dietas con harina de soya y dietas comerciales y se ha evaluado la ventaja de adicionar fitasa o P^{3+} inorgánico en las mismas. El índice de crecimiento y conversión alimenticia fueron significativamente mejores ($p < 0.05$) en comparación a las dietas comerciales. El pre-tratamiento con fitasa aumentó la disponibilidad de P^{3+} en la harina de soya por la hidrólisis del P^{3+} fítico a su forma inorgánica disponible. El transformar el P^{3+} fítico a su forma disponible para reemplazar la suplementación con P^{3+} inorgánico fue utilizada efectivamente en la trucha arcoíris. Los peces alimentados con la dieta comercial y con la dieta suplementada con P^{3+} inorgánico, eliminaron mayor cantidad de este nutriente en las heces, en comparación a los peces alimentados con la harina de soya pre-tratada con fitasa.¹²⁹ Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra investigación, ya que la eliminación de P^{3+} en las heces de los camarones alimentados con la dieta FTE II con harina de soya y canola pre-tratadas con fitasa con respecto a los camarones alimentados con la dieta Control fue menor. Esto se refleja en índices de digestibilidad aparente de fósforo total mayores en la dieta FTE II.

Se han utilizado fitasas microbianas (Natuphos[®] 5000G) suplementadas con cebada, harina de canola, trigo y afrechillo de trigo para probar la efectividad de la fitasa sobre la digestibilidad de proteína, energía y minerales en la trucha arcoíris. El promedio del coeficiente de digestibilidad aparente en ingredientes suplementados y no suplementados con fitasa fueron: proteína, 97.3% y 96.5%, energía, 62.8% y 53.1% y en cuanto a P^{3+} inorgánico, 87.5% y 22.3%, respectivamente.¹³⁰

Aunque todos estos resultados son en peces y no en camarones, debido a que en esta última especie no se ha evaluado la digestibilidad de P^{3+} , con esta investigación se puede abrir brecha a estudios posteriores sobre el camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* u otras especies de camarón cultivado para apoyar o contradecir los resultados obtenidos. Sin embargo, aunque se obtuvieron buenos resultados en cuanto a digestibilidad de P^{3+} , no se observaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento en los tres tratamientos, lo que probablemente nos indique que en camarón, a diferencia de peces, la fitasa no tiene un efecto significativo en cuanto al crecimiento de los crustáceos.

La importancia de determinar la digestibilidad de los alimentos tiene aplicación a nivel producción, ya que de hacerse de manera permanente en las empresas dedicadas a la fabricación de los mismos, le será más fácil a los productores tener una idea clara de las características de los alimentos disponibles en el mercado y les permitirá tener mejores bases para elegir el más adecuado. Algunos estudios hechos en cuanto a digestibilidad en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* se resumen en el Cuadro 25:

Cuadro 25.

**VALORES DE DIGESTIBILIDAD APARENTE DE MATERIA SECA Y DE
PROTEÍNA OBTENIDOS EN EL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO
Litopenaeus vannamei POR DIFERENTES AUTORES**

PARÁMETRO	INGREDIENTE	PORCENTAJE DE DIGESTIBILIDAD	AUTOR
DAMS	Dieta comercial	66-70%	Cruz Suárez, <i>et al.</i> ¹³¹
DAP		69-74%	
DAMS	Harina de pescado	64.3%	Akiyama, <i>et al.</i> ¹³²
	Harina de Soya	55.9%	
DAP	Harina de pescado	80.7%	Ezquerria, <i>et al.</i> ¹³³
	Harina de soya	89.9%	
DAP	Harina de soya	90.9%	
	Harina de anchoa	83.6%	
	Harina de residuos de atún	63.5%	
	Harina de pescado blanco deshuesado	86.6%	
	Harina de pescado	67.1%	
DAMS	Harina de soya	61-85%	Divakaran, <i>et al.</i> ⁹⁰
DAP		89%	

DAMS: Digestibilidad Aparente de Materia Seca.

DAP: Digestibilidad Aparente de Proteína.

Los valores reportados en la presente investigación concuerdan con la mayoría de estos estudios y de hecho, se puede decir que se obtuvieron valores por arriba de los datos reportados en la literatura en cuanto a digestibilidad aparente de materia seca y de proteína. Por lo tanto, las dietas hechas con fuentes de proteína vegetal favorecen la digestibilidad del alimento aún más que los alimentos hechos con fuentes de proteína animal, principalmente harina de pescado. Sin embargo, sería interesante hacer este mismo estudio con el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* que describen los autores, ya que la comparación que se hace con estas investigaciones es con datos obtenidos con la especie de camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum*.

Los camarones requieren un nivel alto de proteína, por lo tanto, deben elegirse ingredientes con un porcentaje alto de este nutriente. En base a la literatura revisada y los resultados obtenidos se puede decir que las fuentes de proteína vegetal, principalmente la soya, son buena opción para sustituir la harina de pescado, la cual es muy cara y tiene una alta demanda en el mercado.

En los camarones la actividad enzimática varía en función del ciclo de muda, ciclo circadiano, desarrollo (larvario, de crecimiento, de reproducción), tipo de alimento y factores ambientales. En cuanto a fuentes de proteína, dada la importancia de la tripsina, mientras más aminoácidos básicos tenga la proteína, la capacidad de hidrólisis será mayor y por tanto, la digestibilidad y eficiencia alimenticia. Los ingredientes cuyas proteínas son ricas en arginina, lisina e histidina son excelentes fuentes de proteína, por ejemplo: harinas de pescado, cabeza de camarón, harina de calamar, harina de krill y pasta de soya.⁴⁴ En este estudio se concluyó que los altos valores obtenidos en el coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca y de proteína no fueron por la influencia de la enzima fitasa, ya que la actividad de esta no fue significativa ($p > 0.05$) para las dietas que registraron un alto coeficiente de digestibilidad aparente (Ronozyme[®] P5000 y FTE II) en comparación con la dieta Control.

Jones *et al.* (1997), mencionan que la baja actividad de la tripsina se encuentra asociada con una dieta altamente digestible;¹³⁴ en contraparte, Kumlu *et al.* (1995) señalan que una dieta de mala calidad genera una alta actividad enzimática, en consecuencia se deduce que la calidad de la proteína puede regular la actividad de las enzimas en larvas de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*,¹³⁵ lo que podría indicar que el motivo por el cual la dieta Control utilizada en el ensayo registró la mayor actividad trípica y un bajo

coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca y proteína en comparación a los otros dos tratamientos fue debido a la alta concentración de ácido fítico, el cual no fue hidrolizado por la adición de ningún tipo de enzima exógena (fitasa) provocando un sobre esfuerzo a nivel enzimático del animal por intentar digerir y absorber la proteína de la dieta. Esto no sucedió con la dieta Ronozyme[®] P5000 y FTE II, ya que ambas registraron una baja actividad de la tripsina y un alto coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca y proteína, lo que podría indicar que la baja actividad de esta enzima no interfiere con la digestibilidad de los alimentos.

Algunos autores reportan una correlación entre la tripsina y la quimiotripsina en vertebrados;¹³⁶ sin embargo, los estudios realizados en crustáceos no son concluyentes pues unos presentan una nula correlación en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*^{110,137} y en otros estudios si la hay, sobre todo con post-larvas de camarón blanco norteamericano *Litopenaeus setiferus*.¹⁰⁹ En este caso, los resultados obtenidos en este trabajo podrían refutar esa correlación entre tripsina y quimiotripsina, sobre todo en la dieta Control, la cual registró diferencias significativas ($p < 0.05$) teniendo una alta actividad en ambas enzimas, en comparación con las otras dos dietas.

La actividad de la α -amilasa y proteasas es modulada por la composición de la dieta. Esta actividad aumenta conforme se aumenta la proteína en las dietas, ya sea en medio natural o artificial. Por encima del porcentaje óptimo, alrededor de un 40-50% de proteína en la dieta, la actividad de ambas enzimas empieza a disminuir.¹³⁸ Diversos autores reportan que en los estadios de inter-muda C y pre-muda inicial D0 la actividad enzimática se encuentra estable pero dicha actividad es alterada por diversos factores (ambientales, origen y calidad

de la proteína de la dieta).^{139,140} Sánchez-Paz *et al.* (2003), mencionan que la muda si afecta la actividad de la tripsina.¹⁴¹

En este caso, las diferencias significativas ($p < 0.05$) registradas en la actividad de la tripsina, quimotripsina, proteasas totales y carboxipeptidasa B se debieron al factor dieta y no al factor muda de los animales. Los valores de las enzimas en cuanto al factor dieta, no se relacionaron con el alto grado de digestibilidad de nutrientes alcanzado en los tratamientos con la dieta Ronozyme[®] P5000 y FTE II. Sin embargo, la carboxipeptidasa B registró diferencias significativas en la primera, la cual tuvo significancia ($p < 0.05$) en el coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca y proteína, a diferencia de la dieta Control y FTE II.

Algunos autores mencionan que la quimotripsina presenta un fuerte incremento correlativo al crecimiento.¹³⁷ Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias significativas en el crecimiento y supervivencia de varias especies de camarón (camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*, camarón marrón *P. aztecus*, camarón rosado *P. duorarum*, camarón blanco nortño *P. setiferus*, camarón blanco sureño *P. schmitti*, camarón azul *P. stylirostris*) evaluados en animales alimentados con dietas comerciales con un 10% de inclusión de harina de soya y alimento experimental con inclusión del 40 al 50% en condiciones de laboratorio.¹⁴² Biswas *et al.* usaron fitasa en dietas hechas con harina de soya para evaluar el crecimiento en el camarón negro *Penaeus monodon* y no encontraron diferencias significativas al suplementar con la enzima; sin embargo, se obtuvo una baja excreción de P^{3+} en el agua.¹⁴³

Lim y Dominy (1993) evaluaron el reemplazo de la proteína animal por soya y encontraron que el crecimiento se redujo conforme se incrementó la inclusión de soya a 42, 56 y

70%.¹⁴⁴ A esta misma conclusión llegaron Álvarez *et al.* (2007) al evaluar la ganancia de peso y el crecimiento en juveniles de camarón blanco sureño *Penaeus schmitti* en dietas con diferentes porcentajes de sustitución entre harina de pescado y soya de 46, 59, 75, 88 y 100%, obteniendo los mejores resultados en la dieta con 75% de harina de soya, mientras que en la dieta con 100% de este ingrediente se obtuvieron los valores más bajos en el crecimiento de los animales. El porcentaje de supervivencia fue aceptable en todos los tratamientos (mayor de 90%) y no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos.¹⁴⁵ Esto podría explicar porqué en este ensayo no se obtuvieron diferencias entre las dietas en cuanto al crecimiento, ya que se usó un porcentaje de inclusión de harina de soya de 10% por cada 100 g de alimento. Probablemente se podría hacer un ensayo posterior utilizando un porcentaje de inclusión mayor al utilizado, usando como referencia los resultados obtenidos en la literatura citada. Inclusive, ni la adición de fitasa en el alimento favoreció el crecimiento de los camarones en ninguno de los tratamientos.

La canola posee una adecuada calidad nutricional. Su inclusión de 25% ha dado resultados favorables en dietas para salmón, mientras que niveles del 20% no afectan el crecimiento de la trucha juvenil o adulta.^{146,147} La canola tampoco afecta el crecimiento de tilapias cuando se incluye hasta un nivel del 50% en su dieta,¹⁴⁸ observándose que lo reduce a niveles superiores debido a sus factores anti-nutricionales. Por el contrario, Davies *et al.* (1990) observaron una reducción del crecimiento de tilapia con un 5% de inclusión de harina de canola.¹⁴⁹

Al incluir este mismo ingrediente en la dieta del salmón, esta causó una reducción significativa del crecimiento y el rechazo al consumo conforme se aumentó el porcentaje de inclusión del 13 al 25%.¹⁴⁶ En el caso de este ensayo, se utilizó un porcentaje de inclusión

de harina de canola de 24.5% por cada 100 g de alimento y no se obtuvieron resultados significativos ($p>0.05$) en cuanto a crecimiento, igual que la mayoría de los estudios hechos con peces.

Suárez (2008) logró reemplazar un 80% de la proteína animal marina usando una mezcla de fuentes vegetales (70% de harina de soya y 30% de harina de canola) en dietas para camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, reduciendo la cantidad de harina de pescado de 30 a 6 g por cada 100 g de peso seco y obteniendo valores altos en sobrevivencia, crecimiento y en el coeficiente de digestibilidad aparente.¹⁵⁰ En este trabajo de investigación se usaron ambas fuentes de proteína y también se obtuvieron buenos resultados en cuanto al coeficiente de digestibilidad aparente; no obstante, en cuanto al crecimiento no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre ningún tratamiento, aunque el porcentaje de supervivencia en general, si es aceptable (80%).

CONCLUSIONES

Pre-tratar harinas vegetales con enzimas de origen microbiano mejora la asimilación, absorción y digestión de nutrientes. Este mejoramiento está ligado al efecto hidrolizable que tiene la fitasa sobre el ácido fítico, factor anti-nutricional que reduce la formación de complejos entre fitato-proteína por los subproductos de la hidrólisis de P^{3+} , lo que se vio reflejado en un alto porcentaje de digestibilidad aparente de fósforo total, de materia seca y de proteína en las dietas pre-tratadas con fitasa de origen microbiano (FTE II) y fitasas exógenas añadidas durante la elaboración de las dietas (Ronozyme[®] P5000), además de obtener una buena actividad enzimática para los animales, sin alterar la digestibilidad de los nutrientes, en especial de proteínas.

Todo ello hace pensar que la adición de la enzima fitasa líquida de origen microbiano FTE II favorece la biodisponibilidad de P^{3+} , materia seca y proteína, al hacer a estos elementos más accesibles a la acción de las enzimas digestivas. Se podría considerar que el uso de este tipo de tecnología enzimática es una buena alternativa para mejorar la rentabilidad de los sistemas de cultivo de camarón, al reducir los costos de alimentación.

También queda en evidencia que el uso de enzimas exógenas de tipo comercial en dietas vegetales también mejora el coeficiente de digestibilidad aparente de fósforo total, de materia seca, de proteína y actividad enzimática, lo que podría considerarse una opción extra a utilizarse en la fabricación de alimentos para camarón. Sin embargo, deben tomarse en cuenta los costos que existen entre el uso de fitasas de origen microbiano contra fitasas exógenas de tipo comercial.

REFERENCIAS

1. DEPARTAMENTO DE PESCA Y ACUICULTURA. El estado mundial de la pesca y acuicultura 2010. Roma (Italia): FAO, 2010.
2. COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2008. México (Mazatlán): SAGARPA, 2008.
3. ROSENBERRY B. World Shrimp Farming 2004. An annual report. In: ROSENBERRY B, editor. Shrimp News International, EUA, 276 pp.
4. MUÑOZ O. Comparación entre extruido y pelletizado en alimentos de camarones. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII SIMPOSIUM Internacional de Nutrición Acuícola; 2004 noviembre 16-19; Hermosillo (Sonora) México, 2004: 397-417.
5. ÁLVAREZ F, GRACIA A, SOTO L. Crecimiento y mortalidad de las fases estuarinas del camarón rosado *Penaeus (Farfantepenaeus) duorarum* (Burkenroad, 1939) en la laguna de términos, Campeche, México. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología 1987; 2: 133-146.
6. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ M, ARREGUÍN-SÁNCHEZ F, LLUCH-BELDA D. Efecto de la temperatura superficial y salinidad en el reclutamiento del camarón rosado *Farfantepenaeus duorarum* (Decapoda: Penaeidae), en la Sonda de Campeche, Golfo de México. Revista de Biología Tropical 2006; 54(4): 1241-1245.
7. UNIDAD DE EDUCACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL MAR. Diseño, instalación y operación de una unidad para la obtención de post-larva de camarón. Secretaría de Educación Pública 1994: 24-30.
8. PÉREZ-FARFANTE I, KENSLEY B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Key and diagnoses for the families and genera. Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle 1997; 175: 502.
9. GRACIA A. Pesquería artesanal del camarón. In: FLORES-HERNÁNDEZ D, SÁNCHEZ-GIL P, SEJO JC, ARREGUÍN-SÁNCHEZ F, editors. Analisis y diagnostico de los recursos pesqueros críticos del Golfo de México. Campeche: Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 1997: 173-184.
10. MARTÍNEZ-CORDOVA LR, VILLAREAL-COLMENARES H, CORTÉS-JACINTO E. Biología del camarón. In: MARTÍNEZ-CORDOVA L, editor. Cultivo de camarones peneidos. Principios y prácticas. Distrito Federal, 1990: 1-21.
11. NAVARRETE DEL PRO A, GRACIA-GASCA A. La pesquería de camarón en altamar, Golfo de México y Caribe Mexicano 1992; 29-30.

-
12. FUSS CM. Observations on burrowing behavior of the pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. Bulletin of Marine Science Gulf of Mexico and Caribbean 1964; 14: 62-73.
13. HUGHES DA. Factors controlling emergence of pink shrimp (*Penaeus duorarum*) from the substrate. Biological Bulletin 1968; 134 (1): 48-59.
14. VAN LOPIK JR, DRUMMOND KH, CONDREY RE. Draft environmental impact statement and fishery management plan for the shrimp fishery of the Gulf of Mexico, United States Waters. Gulf of Mexico Fishery Management Council 1979.
15. RE-REGIS MC. Madurez gonádica del camarón rosado *Penaeus duorarum* en la Sonda de Campeche. CRIP Lerma, Campeche. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca, 1989.
16. GARCÍA T, GAXIOLA G, GARCÍA T, PEDROZA R, SOTO L, LÓPEZ N, ROSAS C. Influencia de las proteínas dietéticas sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de las post-larvas del camarón blanco (*Penaeus setiferus*) y del camarón rosado (*P. duorarum*) del Golfo de México. Revista AQUATIC [serial online] 1998 Feb [cited 2010 Nov 15]; 2: [24 screens]. Available from: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=23>.
17. GUITART B, HONDARES A. Crustáceos. Revista Cubana de Investigación Pesquera 1980; 5: 1-52.
18. GRACIA A, VÁZQUEZ-BADER A, ARREGUÍN-SÁNCHEZ F, SCHULTZ-RUIZ LE, SÁNCHEZ JA. Ecología de camarones peneidos. In: FLORES-HERNÁNDEZ D, SÁNCHEZ-GIL P, SEIJO JC, ARREGUÍN-SÁNCHEZ F, editors. Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México. Campeche: Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 1997: 127-144.
19. GALICIA G. Obtención de los parámetros del crecimiento individual en camarones peneidos como respuesta a las tasas de ingestión y absorción de alimento a diferentes temperaturas. *Litopenaeus vannamei* como modelo experimental (tesis de maestría en revisión). 2007
20. ROSAS C, CARRILLO O, WILSON R, ANDREATTA E. Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica. 1era ed. México: Subprograma II "Acuacultura" Red Temática II.C, 2006.
21. DALL W, MORIARTY DJW. Functional aspects of nutrition and digestion. In: MANTEL LH, editor. The Biology of Crustacea Vol. 5. International Anatomy and Physiological Regulation. New York: Academic Press, 1983: 215-251.
22. CUARTAS EI, DÍAZ AC, PETRIELLA AM. Estudio morfológico y funcional del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* Bate (Crustacea, Penaeoidea). Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero 2000; 15: 5-13.

-
23. GIBSON R, BARKER PL. The decapods hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Annual Reviews* 1979; 17: 285-346.
24. ICELY JD, NOTT JA. Digestion and absorption: digestive system and associated organ. In: HARRISON FW, HUMES AG, editors. *Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod, Crustacea*, Vol. 10. New York: Wiley-Lyss Inc, 1992: 147-201.
25. JACOBS W. Untersuchungen über die cytologie der sekretbildung in der mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. *Z. Zellforsch* 1928; 8(1): 1-62.
26. DAVIS LE, BURNETT AL. A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish. *Developmental Biology*. 1964; 10: 122-153.
27. AL-MOHANNA S, NOTT JA. Functional cytology of the hepatopancreas of *P. semisulcatus* (Crustacea, Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology*. 1989; 101: 535-544.
28. MIYAWAKI M, SASAKI N. A preliminary report on uptake of Ca⁴⁵ by the hepatopancreas of the crayfish, *Procambarus clarkia*. *Kumamoto Journal of Science*. 1961; 6: 1-11.
29. SOUSA LG, PETRIELLA AM. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentine*s (Crustacea, Caridea). *Biocell* 2000; 24(3): 189-195.
30. JOHNSTON DJ, ALEXANDER CG, YELLOWHEES D. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). *Journal of Crustacean Biology* 1998; 18(21): 271-278.
31. MOYANO F. Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en nutrición. In: CRUZ L, RICQUE D, TAPIA M, NIETO M, VILLAREAL D, PUELLO A, GARCÍA A, editors. *Avances en nutrición acuícola VIII. Simposium internacional de Nutrición Acuícola*; 2006 noviembre 15-17; Nuevo León (Monterrey). México (Monterrey): Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 2006: 396-409.
32. GARCÍA CFL. Predicción de la digestibilidad de proteína en el camarón y uso de ingredientes proteicos de segunda generación en alimentos para acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*; 1998 noviembre 15-18; La Paz (B.C.S.) México. 2000: 440-451.
33. JORY DE. Manejo integral del alimento de camarón, de estanques de producción camaroneros, y principios de bioseguridad. *Curso lance en acuicultura*; 2001 marzo 26-30; Monterrey (Nuevo León) México. 2001: 1-76.
34. GUILLAUME J. Protein and Amino Acids. In: D'ABRAMO LR, CONCLIN DE, AKIYAMA DM, editors. *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*, Louisiana: Baton Rouge, 1997: 26-41.

-
35. HARRISON KE. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapods crustaceans: a review. *The Journal of Shellfish Research* 1990; 9(1): 1-28.
36. ESPINOSA J, LABARTA U. *Nutrición en Acuicultura*. Madrid: Industrias Gráficas España, 1987.
37. GAXIOLA G. Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *Penaeus duorarum* (Crustacea: Penaeidae) (tesis de doctorado). México (Distrito Federal) México: Facultad de Ciencias, 1994.
38. TACON GJ, COWEY CB. Protein and amino acid requirements. In: TITLER P, CALOW P, editors. *Fish energetic: new perspectives*. London: Croom Helm, 1985:155-183.
39. PILLAY TVR, KUTTY MN. *Aquaculture. Principles and practices*. 2nd ed. India: Blackwell Publishing Ltd, 2005.
40. AKIYAMA D, DOMINY W, LAWRENCE A. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*; 1994 febrero 12-14; Monterrey (Nuevo León) México, 1993: 43-79.
41. PIKE IH. Productos marinos para acuicultura: el futuro. *Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*; 1994 noviembre 7-9; Nuevo León (Monterrey) México. 1994: 191-204.
42. BARROS A, ALARCÓN F, MOYANO F, MARTÍNEZ T. Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis in vitro de la proteína en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 2002; 18: 95-98.
43. HARDY R. Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*; 2006 noviembre 15-17; Monterrey (Nuevo León) México, 2006: 410-419.
44. CRUZ-SUÁREZ LE. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*; 1996 noviembre 11-13; Nuevo León (Monterrey) México. 1996:207-232.
45. LIM C, KLESIUS PH, DOMINY W. Soybean products. *International Aqua Feeds* 1998; 3: 17-23.
46. LIENER IE. Implication of anti-nutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1994; 34(1): 31-67.

-
47. LIM C, KLESIUS PH, HIGGS DA. Substitution of canola meal for soybean meal in diets for channel catfish *Ictalurus punctatus*. Journal of the World Aquaculture Society 1998; 29: 161-168.
48. HIGGS DA, DOSANJH BS, LITTLE M, ROY RJJ, McBRIDE JR. Potential for including canola products (meal and oil) in diets for *Oreochromis mossambicus x O. aureus* hybrids. Proc. Third. Int. Symp. on Feeding and Nutr. in fish; 1989 agosto-septiembre 28-1; Toba (Japón), 1989: 302-314.
49. DABROWSKI K, EVANS R, CZARNOCKI J, KOZLOWSKA. Rapeseed meal in the diet of common carp reared in the heated waters. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 1982; 48: 1-9.
50. GARCÍA T, VILLARREAL-COLMENARES H, FENUCCI J, editores. Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. 1° ed. Argentina: EUDEM, 2007.
51. GAXIOLA G, GARCÍA T, JAIME B, GONZÁLEZ R. Evaluación de diferentes razones de proteína animal/vegetal en dietas para postlarvas de camarón blanco *Penaeus schmitti*. Revista de Investigaciones Marinas 1996; 17(1): 73-84.
52. GARCÍA T. Estado del Arte de la Investigación Científica en Nutrición de Peneidos. Memorias del Taller “La Investigación Científica en Camarones Peneidos de Iberoamérica”; 1996 junio 10-14; San Pedro de Manglaralto (Ecuador), 1996: 13-21.
53. FOX JM, LAWRENCE AL, LI-CHAN E. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free aminoacid sources. Aquaculture 1995; 131: 279-290.
54. HOUSER RH, AKIYAMA DM. Feed Formulation Principles. In: D’ABRAMO LR, CONCLIN DE, AKIYAMA DE, editors. Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society. LA: Baton Rouge, 1997: 493-587.
55. ROMERO JJ, CASTRO E, DÍAZ AM, REVECO M, ZAKDIVAR J. Evaluation of methods of certify the “Premium” quality of Chilean fish meals. Aquaculture 1994; 124: 351-358.
56. VALLARDI GM. Efecto de la fitasa en dietas para gallina de postura como fuente de energía, aminoácidos y fósforo (tesis de maestría). Colima (Colima) México: Universidad de Colima, 2000.
57. GOYOAGA JC. Estudio de factores no nutritivos en “Vicia FABA I.”: Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo (tesis de doctorado). Madrid (España) España: Universidad Complutense de Madrid, 2005.

-
58. LEI X.G., STAHL C.H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Spring-Verlag 2001; 57: 474-481.
59. GUERRERO M, RODRÍGUEZ L, VIADER J. Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris*. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal 2007; 10:413-418.
60. DAVIS DA, JOHNSTON WL, ARNOLD CR. El uso de suplementos enzimáticos en dietas para camarón. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 1998 noviembre 15-18; La Paz (B.C.S.) México.
61. PEARL SE, BERY LR, MARTIN DW. Biología. 5ta ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2001.
62. NELSON TS. The hydrolysis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. Poultry Science 1976; 55: 2262-2264.
63. WILLIAMS SG. The role of phytic acid in the wheat grain. Plant Physiology 1970; 45: 376-381.
64. CABRERA M, PUERTO M, RAMOS A, SAADOUN A, MARCHESONI A. Evaluación de la biodisponibilidad del fósforo orgánico e inorgánico a través de la solubilidad *in vitro* y utilización *in vivo*. Agrociencia 2002; 6:69-78.
65. GÓMEZ, C. Determinación y cuantificación de mioinositol y ácido fítico en alimento y contenido intestinal de salmón mediante HPLC acoplado a detector de índice de refracción (tesis de licenciatura). Valdivia (Chile) México: Universidad Austral de Chile, 2005.
66. ULLAH A, SETHUMADHAVAN K, MULLANEY E. Salt effect on the pH profile and kinetic parameters of microbial phytases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008; 56: 3398-3402.
67. GREINER R, KONIETZNY U. 2006. Phytase for food application. Food Technology Biotechnology 2006; 44: 125-140.
68. WANG J. Managing shrimp pond water to reduce discharge problems. Aquacultural Engineering 1990; 9: 61-73.
69. CRAB R, AVNIMELECH Y, DEFOIRDT T, BOSSIER P, VERSTRAETE W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture 2007; 270: 1-14.
70. TACON AGJ, FOSTER IP. Aquafeeds and the environment: policy implications. Aquaculture 2003; 226: 181-189.

-
71. ALONSO-RODRÍGUEZ R, PÁEZ-OSUNA F. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture* 2003; 219: 317-336.
72. MARTÍNEZ CÓRDOVA LR, ENRÍQUEZ-OCAÑA F. Study of the benthic fauna in a discharge lagoon of a shrimp farm with special emphasis on polychaeta. *Journal of Biological Sciences* 2007; 7: 12-17.
73. DEUTSCH L, GLASLUND S, FOLKE C, TROELL M, HUITRIC M, KAUTSKY N, LEBEL L. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Global Environmental Change* 2007; 17: 238-249.
74. REBOLLAR PG, MATEOS GG. El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. En *Curso de Especialización FEDNA: Avances en nutrición y alimentación animal*. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 1999.
75. GÓMEZ-VILLALVA PELAYO E. Transformación y mejora del valor nutritivo de la harina de guisante mediante la adición de enzima fitasa (tesis de doctorado). Granada (España) España: Universidad de Granada, 2005.
76. HARPER-DENIS J. En: *Biotechnology in the feed industry*. Proc. Alltech's 15th Annual Symposium. Nottingham University Press, 1999: 511-522.
77. LEYVA R. Uso de harinas de *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum* spp. en alimentos balanceados para el camarón *Litopenaeus vannamei*: efectos sobre el crecimiento y la digestibilidad *in vivo* (tesis de maestría). La Paz (B.C.S.) México: CICIMAR-IPN, 2006.
78. SMITH DM, TABRETT SJ. Accurate measurement of *in vivo* digestibility of shrimp feeds. *Aquaculture* 2004; 232: 563-580.
79. MENDOZA R. Métodos para evaluar la digestibilidad proteica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. *Avances en Nutrición Acuícola I. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*; 1993 febrero 12-14; Nuevo León (Monterrey) México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 1993: 155-202.
80. BROWN PB, ROBINSON EH, CLARK AE. Apparent digestibility energy coefficients and associative effects in practical diets for red swamp crayfish. *Journal of the World Aquaculture Society* 1989; 20: 122-126.
81. CRUZ E, RICQUE M, NIETO M. Importancia de la digestibilidad en los alimentos para el camarón. *Panorama Acuícola* 2000; 10: 10-12.

-
82. SMITH LL, LEE PG, LAWRENCE AL, STRAWN K. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 1985, 46: 85-96.
83. SHIAU SY, LIN KP, CHIOU CL. Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and in sea water. *Journal of Applied Aquaculture* 1992, 1: 47-53.
84. LEE PG, LAWRENCE AL. Digestibility. In: D'ABRAMO LR, CONKLIN DE, AKIYAMA DE, editors. *Crustacean Nutrition*. LA: World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1997: 194-260.
85. JONES PL, DE SILVA SS. Comparison of internal and external markers in digestibility studies involving the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture Research* 1998, 29(7): 487-493.
86. GOYTORTÚA E, CIVERA R, GREEN A. Partial replacement of red crab (*Pleuroncode planiples*) meal for fish meal in practical diets for the whites shrimp *L. vannamei*: Effects on growth and *in vivo* digestibility. *Aquaculture* 2006; 256: 414-422.
87. CRUZ-SUÁREZ LE, RICQUE-MARIE D, TAPIA-SALAZAR M, MCCALLUM IM, HICKLING D. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meals (*Brassica* sp) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 2001; 196: 87-104.
88. BAUTISTA-TERUEL M, EUSEBIO P, WELSHN P. Utilization of feed pea *Pisum sativum* meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 2003; 225: 121-131.
89. FAUCON M. Contribution to the low pollution feed for juveniles of *Litopenaeus stylirostris*. Report IFREMER COP 1997; 22.
90. DIVAKARAN S, VELASCO M, BEYER E, FOSTER I, TACON AGJ. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei* including a critique of methodology. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*; 2000 noviembre 19-22; Mérida (Yucatán) México. 2000: 267-276.
91. SUÁREZ JA. Distribución de la energía y análisis del crecimiento en grupos familiares seleccionados genéticamente del camarón *L. vannamei* (Boone, 1931) alimentados con fuentes de proteína vegetal (tesis de doctorado). Nuevo León (Monterrey) México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2008.
92. GARCÍA-CARREÑO FL, HERNÁNDEZ-CORTÉS MP. Enzymes from the digestive system of shrimps. I- State of the Art and future trends in protein digestion. *Memorias del Taller "La Investigación Científica en Camarones Peneidos de Iberoamérica"*; 1996 junio 10-14; San Pedro de Manglaralto (Ecuador), 1996: 13-21.

-
93. CRUZ-SUÁREZ LE. Enzimas digestivas y estudios sobre digestibilidad para organismos acuáticos. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola; 1996 noviembre 11-13; Nuevo León (Monterrey) México. 1996: 207-232.
94. LÓPEZ GJ. Aproximación de los requerimientos nutricionales de los juveniles de camarón blanco *Penaeus schmitti*: evaluación de niveles y fuentes de proteína en la dieta. (tesis de maestría). La Habana (Cuba): Universidad de La Habana, 1999.
95. FENNEMA O. Química de los Alimentos. 2nd ed. España: Acribia, 2000.
96. CECCALDI H. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. Advances in Tropical Aquaculture AQUACOP-IFREMER. Actes de Colloque 1989; 9: 243-259.
97. AHAMAD AS. Evaluation of some animal and plant protein sources in the diet of the shrimp *Penaeus indicus*. Asian Fisheries Society 1992; 5: 277-289.
98. CHAMBERLAIN GW. Investigación de frontera en nutrición acuícola. Avances en Nutrición Acuícola II. Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola; 1994 noviembre 7-9; Monterrey (N.L.) México; 1999: 27-43.
99. TREVIÑO LM, CELIS GR. Uso de soya en acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola II. Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola; 1994 noviembre 7-9; Monterrey (N.L.) México; 1994: 171-183.
100. BUCHANAN J, SARAC HZ, POPPI D, COWAN RT. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. Aquaculture 1997; 151: 29-35.
101. DAVIS AD, ARNOLD CR. Apparent protein digestibility coefficients for *Penaeus vannamei* offered diets supplemented with an acidifying agent or a general protease. World Aquaculture Society Book of Abstract; 1998 febrero 15-19; Las Vegas (Nevada) USA; 1998: 646 p.
102. VAN WEERD JH, KHALAF KH, AARTSEN EJ, TIJSSEN PA. Balance trials with African catfish *Clarias gariepinus* fed phytase-treated soybean meal-based diets. Aquaculture Nutrition 1999; 5(2): 135-142.
103. VIELMA J, RUOHONEN K, GABAUDAN J, VOGEL K. Top spraying soybean mealbased diets with phytase improves protein and mineral digestibility but not lysine utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 2004; 35(10): 955-964.

-
104. RICQUE-MARIE D, CRUZ SUÁREZ E, *et al.* Effect of a Phytase Product on Protein and Phosphorus Digestibility in Shrimp *Litopenaeus vannamei* Fed an Air Classified Pea Protein Flour (Pfp) Based Diet. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 2004 noviembre 16-19; Sonora (Hermosillo) México.
105. LEE PG, LAWRENCE AL. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. Journal of the World Mariculture Society 1985; 16: 275-287.
106. AKIYAMA DM, DOMINY WG, LAWRENCE AL. Penaeid Shrimp Nutrition for the Commercial Feed Industry. Proceedings of the Aquaculture feed Processing and Nutrition Workshop 1989. 80-98.
107. AKIYAMA DM. Soybean meal utilization by marine shrimp. American Soybean Association 1991. 5-237.
108. CRUZ-SUÁREZ LE, TAPIA-SALAZAR M, VILLARREAL-CAVAZOS D, BELTRÁN-ROCHA J, NIETO-LÓPEZ MG, LEMME A, *et al.* Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture 2009; 292: 87-94.
109. GUZMÁN C, GAXIOLA G, ROSAS C, TORRE-BLANCO A. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. Aquaculture Nutrition 2001; 7: 113-122.
110. LE MOULLAC G, KLEIN B, SELLOS D, VAN WORMHOUDT A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 1996; 208: 107-125.
111. MOLINA C, CADENA E, ORELLANA F. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: CRUZ-SUÁREZ LE, RICQUE-MARIE D, TAPIA-SALAZAR M, OLVERA-NOVOA MA, CIVERA- CERECEDO R, editors. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 2000 noviembre 19-22. Mérida Yucatán, México.
112. KNUCKLES BE, BETSCHART AA. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. Journal of Food Science 1987; 52: 719-721.
113. DESPHANDE SS, CHERYAN M. Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. Journal of Food Science 1984; 49: 516-519.

-
114. SINGH M, KRIKORIAN AD. Inhibition of trypsin activity on vitro by phytate. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 1982; 30: 799-800.
115. INAGAWA J, KIYOSAWA I, NAGASAWA T. Effect of phytic acid on the digestion of casein and soybean protein with trypsin, pancreatic and pepsin. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science* 1987; 40: 367-373.
116. EMERENCIANO MGC, WASIELESKY W, SOARES RB, BALLESTER EC, IZEPI EM, CAVALLI, RO. Cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* na fase de berçário em meio ao floco microbiano. *Acta Scientiarum. Biological Science* 2007; 29 (1): 1-7.
117. TAUSSKY HH, SHORR E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *Journal Biological Chemistry* 1952; 202:675-685.
118. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) (1995) In: *Official Methods of Analysis*, 16th edn, (ed. por K. Helrich), 1234 pp. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
119. CHO CY, SLINGER SJ. Apparent digestibility measurements in feedstuffs for rainbow trout. In: HALVER JE, TIEWS K, editors. *Finfish nutrition and fishfeed technology*, II. Berlin: Heenemann Verlagsgesellschaft, 1979: 239-247.
120. CUZON G, FAUCON E. Report interne Ifremer 1998; (52).
121. TOOD EW. Quantitative studies on the total plasmin and the trypsin inhibitor of human blood serum. *J. Explt. Med.* 1949; 89: 295-308.
122. GALLARDO P. Alimentos artificiales con hidrolizados proteicos de origen marino en la nutrición de larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (BONNE, 1931) (tesis de doctorado). México (D.F.) México: Posgrado de Ciencias del Mar, UNAM, 2005.
123. WICKINS JF. Prawn biology and cultura. *Oceanography and Marine Biology* 1976; 14: 435-507.
124. HALL DNF. Observations on the taxonomy and biology of some Indo-West-Pacific-Penaeidae (Crustacea, Decapoda). *Fishery Publications* 1962; 17: 1-229.
125. LIAO IC, HUANG TL. Experiments on the propagation and cultura of prawns in Taiwan. In PILLAY TVR, editor. *Coastal Aquaculture in the Indo-Pacific Region*. England: Fishing News Books Ltd., 1972: 328-354.
126. SCHWAMBORN R, CRIALES MM. Feeding strategy and daily ration of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in a South Florida seagrass bed. *Marine Biology* 2000; 137: 139-147.

-
127. CHONG VC, SASEKUMAR A. Food and feeding habits of the white prawn *Penaeus merguensis*. Marine Ecology Progress Series 1981; 5: 185-191.
128. MARTÍNEZ CA, CHÁVEZ MC, OLVERA MA, ABDO MI. Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola; 1996 noviembre 11-13; Nuevo León (Monterrey) México, 1996: 279-324.
129. CAIN KD, GARLING DL. Pre-treatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. The Progressive Fish-Culturist 1995; 57: 114-119.
130. CHENG ZJ, HARDY RW. Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat and wheat middlings, measured *in vivo* using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture nutrition 2002; 8: 271-277.
131. CRUZ-SUÁREZ LE, RICQUE-MARIE D, TAPIA-SALAZAR M, MARIN-ZALDIVAR LF, GUAJARDO-BARBOSA C, NIETO-LÓPEZ M, SALINAS-MILLER A. Historia y estatus actual de la digestibilidad y algunas características físico-químicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola; 2002 septiembre 3-6; Cancún (Quintana Roo) México, 2002: 1-22.
132. AKIYAMA DM, COELHO SR, LAWRENCE AL, ROBINSON EH. Apparent digestibility of feedstuffs by the Marine Shrimp *Penaeus vannamei* BOONE. Nippon Suisan Gakkaishi 1989; 55(1): 91-98.
133. EZQUERRA JM, GARCÍA-CARREÑO FL, CIVERA R, HAARD NF. pH-stat method to predict protein digestibility in White shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 1997; 157: 251-262.
134. JONES DA, YULE AB, HOLLAND DL. Larval Nutrition. In: D'ABRAMO LR, CONKLIN DE, AKIYAMA DM, editors. Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture. L.A.: Baton Rouge, 1997: 353-389.
135. KUMLU M, JONES DA. Feeding and digestion in the caridean shrimp larva of *Palaemon elegans* Rathke and *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea: Palaemonidae) on live and artificial diets. Aquaculture Nutrition 1995; 1: 3-12.
136. LHOSTE EF, FISZLEWICZ M, GUEUGNEAU AM, CORRING T. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat strain on enzyme activities and messenger RNA levels. The Journal of Nutritional Biochemistry 1994; 5(2): 84-94.

-
137. GAMBOA-DELGADO J, MOLINA-POVEDA C, CAHU C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research* 2003; 34: 1403-1411.
138. LUCIEN-BRUN H, VAN WORMHOUDT A, LACHAUX A, CECCALDI HJ. Effets de regimes composes sur la croissance de homards juveniles, *Homarus gammarus* L.: Estimation biochimique de la composition optimale du regime alimentaire en proteines. *Aquaculture* 1985; 46: 97-109.
139. HERNÁNDEZ-CORTÉS P, QUADROS-SEIFFERT W, NAVARRETE DEL TORO MA, PORTILLO G, COLADO G, GARCÍA-CARREÑO FL. Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system of juvenile White shrimp, *Penaeus vannamei*, during continual feeding. *Journal of Applied Aquaculture* 1999; 9(1): 35-45.
140. SAINZ JC, GARCÍA-CARREÑO FL, CORDOVA-MURUETA JH, CRUZ-HERNÁNDEZ P. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2005; 326: 105-113.
141. SÁNCHEZ-PAZ A, GARCÍA-CARREÑO F, MUHLIA-ALMAZAN A, HERNÁNDEZ-SAAVEDRA NY, YEPIZ-PLASCENCIA G. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2003; 292: 1-17.
142. LAWRENCE AL, CASTILLE FL, STURMER LN, AKIYAMA DM. Nutritional response of marine shrimp to different levels of soybean meal in feeds. USA-Roc economic councils 10th Anniv. Joint of Business Conference; 1986 febrero 16; Taiwan (Taipei) República de China, 1986: 1-9.
143. BISWAS P, PAL AK, SAHU NP, REDDY AK, PRUSTY AK, MISRA S. Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture* 2007; 265: 253-260.
144. LIM C, DOMINY WG. Sustitución de harina comercial de soya por soya integral en dietas para camarón, *Penaeus vannamei*. *Memorias del I Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura.*; 1993 febrero 12-14 ; Nuevo León (Monterrey) México. Nuevo León (Monterrey): Asociación Americana de Soya, 1993: 271-279.
145. ÁLVAREZ JS, HERNÁNDEZ-LLAMAS A, GALINDO J, FRAGA I, GARCÍA T, VILLARREAL H. Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile White shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley 1997). *Aquaculture Research* 2007; 38: 689-695.

-
146. HIGGS DA, McBRIDE JR, MARKERT JR, DOSANJH BS, PLOTNIKOFF MD, CLARKE WC. Evaluation of tower and candle rapeseed (canola) meal and bronowski rapeseed protein concentrate as protein supplements in practical dry diets for juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 1982; 29: 1-31.
147. HARDY RW, SULLIVAN CV. Canola meal in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) production diets. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 1983; 40: 281-286.
148. JACKSON AJ, CAPPER BS, MATTY AJ. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture* 1982; 27: 97-109.
149. DAVIES SJ, McCONNELL S, BATESON RI. Potential of rapeseed meal as an alternative protein source in complete diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). *Aquaculture* 1990; 87: 145-154.
150. SUÁREZ JA. Distribución de la energía y análisis de crecimiento en grupos familiares seleccionados genéticamente del camarón *L. vannamei* (Boone, 1931) alimentados con fuentes de proteína vegetal (tesis de doctorado). Monterrey (Nuevo León) México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1. Proceso de elaboración de las dietas.

1. Tamizar las harinas y demás ingredientes a menos de 250 μ .
2. Pesar los ingredientes con ayuda de una balanza y colocarlos en la mezcladora.
3. Mezclar los polvos durante 20 minutos para homogeneizar correctamente.
4. Agregar los aceites y mezclar 20 minutos más.
5. Agregar el carboximetilcelulosa hasta formar la pasta.
6. Pasar la pasta por el molino de carne (TOR-REY[®] modelo S520) para formar los pellets.
7. Colocar los pellets en la estufa a 60°C durante 24 horas para su secado.
8. Almacenar en frío a 4°C hasta ser utilizados.

ANEXO 2. Análisis Químico Proximal de las dietas experimentales.



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA**

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

Av. Universidad No. 3000 México D.F. Tel. 5622-5907 y 5622-5879 Fax: 5622-5906

Constancia: DNAB-MV-169/10

Hoja 01/01

**MVZ ANGEL GARCÍA HERNÁNDEZ
CIRCUITO INTERIOR
CIUDAD UNIVERSITARIA**

**Muestra.: DNAB-MV-169
DIETA VEGETAL (DIETA A)**

Fecha de recepción: 14.09.10

Análisis Químico Inmediato*

Materia Seca	94.44%
Humedad	5.56%
Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25)	38.15%
Extracto Etéreo	6.61%
Cenizas	7.84%
Fibra Cruda	2.42%
Extracto Libre de Nitrógeno	39.42%

Los resultados se expresan en Base Húmeda

*Método AOAC Químico Proximal (1990)

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cd. Universitaria 24 de septiembre de 2010

P.A.

Q.A. Águeda García Pérez
Responsable del Laboratorio

MPA. MVZ. Sergio C. Angeles Campos
Jefe del Depto. de Nutrición Animal y
Bioquímica

Esta constancia ampara únicamente la muestra analizada. Se prohíbe la reproducción total o parcial de la misma sin previa autorización escrita del responsable del laboratorio. La presente constancia no podrá ser utilizadas para fines legales.



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA**

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

Av. Universidad No. 3000 México D.F. Tel. 5622-5907 y 5622-5879 Fax: 5622-5906

Constancia: DNAB-MV-170/10

Hoja 01/01

**MVZ ANGEL GARCÍA HERNÁNDEZ
CIRCUITO INTERIOR
CIUDAD UNIVERSITARIA**

**Muestra.: DNAB-MV-170
DIETA RONOZYME (DIETA B)**

Fecha de recepción: 14.09.10

Análisis Químico Inmediato*

Materia seca	95.76%
Humedad	4.23%
Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25)	37.94%
Extracto Etéreo	6.46%
Cenizas	6.97%
Fibra Cruda	2.38%
Extracto Libre de Nitrógeno	40.02%

Los resultados se expresan en Base Húmeda

*Método AOAC Químico Proximal (1990)

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria 24 de septiembre de 2010

P.A

Q.A. Águeda García Pérez
Responsable del Laboratorio

MPA. MVZ. Sergio C. Angeles Campos
Jefe del Depto. de Nutrición Animal y
Bioquímica

Esta constancia ampara únicamente la muestra analizada. Se prohíbe la reproducción total o parcial de la misma sin previa autorización escrita del responsable del laboratorio. La presente constancia no podrá ser utilizadas para fines legales.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

Av. Universidad No. 3000 México D.F. Tel. 5622-5907 y 5622-5879 Fax: 5622-5906

Constancia: DNAB-MV-171/10

Hoja 01/01

MVZ ANGEL GARCÍA HERNÁNDEZ
CIRCUITO INTERIOR
CIUDAD UNIVERSITARIA

Muestra.: **DNAB-MV-171**
DIETA FITASA LÍQUIDA FTE (DIETA C)

Fecha de recepción: 14.09.10

Análisis Químico Inmediato*

Materia seca	94.04%
Humedad	5.96%
Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25)	38.44%
Extracto Etéreo	6.29%
Cenizas	7.80%
Fibra Cruda	2.56%
Extracto Libre de Nitrógeno	38.95%

Los resultados se expresan en Base Húmeda

*Método AOAC Químico Proximal (1990)

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria 24 de septiembre de 2010

Q.A. Águeda García Pérez
Responsable del Laboratorio

MPA. MVZ. Sergio C. Angeles Campos
Jefe del Depto. de Nutrición Animal y
Bioquímica

Esta constancia ampara únicamente la muestra analizada. Se prohíbe la reproducción total o parcial de la misma sin previa autorización escrita del responsable del laboratorio. La presente constancia no podrá ser utilizadas para fines legales.

ANEXO 3. Inclusión de fitasa en harina de soya y canola.

➤ Unidades de fitasa/100 g de harina.

Unidades de fitasa agregadas por cada g de harina: 1.6 U/g de harina.

Por cada 100 g de alimento:

10 g soya x 1.6 U/g = 16 U

24.5 g canola x 1.6 U/g = 39.2 U

➤ Cantidad de fitasa agregada.

Actividad de la FTE II: 543 U/ml.

543 U-----1 ml

16 U----- x = 0.0294 ml = 29.4 µl en harina de soya

543 U-----1 ml

39.2 U-----x = 0.0721 ml = 72.1 µl en harina de canola

➤ Cantidad de agua agregada.

Proporción harina:agua (1:1.5)

10 g de soya x 1.5 g de agua = 15 g

24.5 g de canola x 1.5 g de agua = 36.75 g

➤ Incubar durante 15.5 horas a 40-50°C.

➤ Después de la incubación, ambas harinas se incluyen en la elaboración del alimento explicada en el Anexo 1.

ANEXO 4. Horario de actividades para recolección de heces.

7:45 am	Encendido de luz y medición de parámetros físico químicos del agua (O ₂ , temperatura y salinidad).
8:00 am	Sifoneo de residuos (no son útiles), lavado de filtro de arena y rellenado de reservorios con agua de mar.
8:15 am	Alimentación de organismos.
9:15 am	Recolección de heces, sifoneo de alimento, alimentación.
10:15 am	Recolección de heces, sifoneo de alimento, alimentación.
11:15 am	Recolección de heces, sifoneo de alimento, alimentación.
12:15 am	Recolección de heces, sifoneo de alimento, alimentación, lavado y desinfección de piso y rejillas.
1:15 pm	Recolección de heces.
1:30 pm	Lavado y secado de heces.
5:30 pm	Alimentación de organismos, pesaje de alimento.
7:45 pm	Apagado de luz.

ANEXO 5. Recolección de heces.

Con ayuda de un popote, se sifonearon exclusivamente las heces, haciendo que estas cayeran en un papel filtro para cafetera, el cual estaba colocado en un embudo apoyado en una base para evitar que éste se volteara. En el filtro solo quedaban las heces y el agua caía. Entre cada colecta los filtros con heces se doblaban y se guardaban en refrigeración a 4°C hasta ser usados nuevamente. Al terminar la última colecta del día, las heces debían ser lavadas con agua destilada y vaciarse en un recipiente que era guardado en una estufa de secado a 60°C para eliminar la humedad de las muestras. Cada día de colecta se usaba un filtro por tara.

ANEXO 6. Método de Cenizas Insolubles en Ácido (AIA).

Se numeran y se pesan las cápsulas (C) de porcelana y se registra el peso de cada uno de ellos.

A continuación se muelen las muestras (S) de heces (150-200 mg) y alimento (450-600 mg)

Se pesan C + S y se registran los valores.

Se colocan las muestras en una mufla a 550°C durante 6-8 horas o toda la noche.

Se colocan las muestras en un desecador y se espera que alcance la temperatura ambiente.

Se pesan nuevamente y se registran los pesos.

Las cenizas son colocadas (de manera individual) en un tubo de digestión de 80 ml y se agregan 50 ml de HCl 4 N (en campana de extracción).

Los tubos se ponen a hervir durante 30 minutos (en campana de extracción).

Posteriormente, el contenido de cada tubo es filtrado en papel Waltman No. 40 libre de cenizas con ayuda de un matríz Kitasato.

Los papeles serán colocados en la cápsula de porcelana original de la muestra correspondiente.

Seguidamente se colocan las muestras en la mufla a 550°C durante 4-6 horas.

Por último, se colocan las muestras en un desecador a la espera de que se alcancen la temperatura ambiente, se pesan y se registran los valores.

Calcular el % de zeolita de cada muestra.

ANEXO 7. Determinación de fósforo total en alimentos y heces.

Se pesan 200 mg de muestra de alimento y de heces maceradas previamente y se coloca cada muestra en un crisol.

Se meten los crisoles a la mufla durante 2 horas a 550°C.

Sacar de la mufla y dejar enfriar en el desecador.

Las cenizas obtenidas se disuelven en 2 ml de HCl concentrado y 10 ml de agua destilada (calentada previamente hasta llegar a 100°C) y después se afora en un matraz de 100 ml con agua destilada.

Para las muestras de alimento, se toma 1 ml del matraz y se vierten en un tubo de ensaye. Se adicionan 9 ml de agua destilada y 0.5 ml de solución de molibdato-ácido ascórbico.

En el caso de las muestras de heces, se toman 250 µl del matraz y se vierten en un tubo de ensaye. Se adicionan 9 ml de agua destilada y 0.5 ml de solución de molibdato-ácido ascórbico.

Dejar las muestras 60 minutos para permitir la liberación de fósforo de las muestras.

Leer la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro de microplaca a 800 nm (poner en cada pozo 220 µl de la muestra) (Figura 17).

La lectura de cada muestra debe hacerse por triplicado.

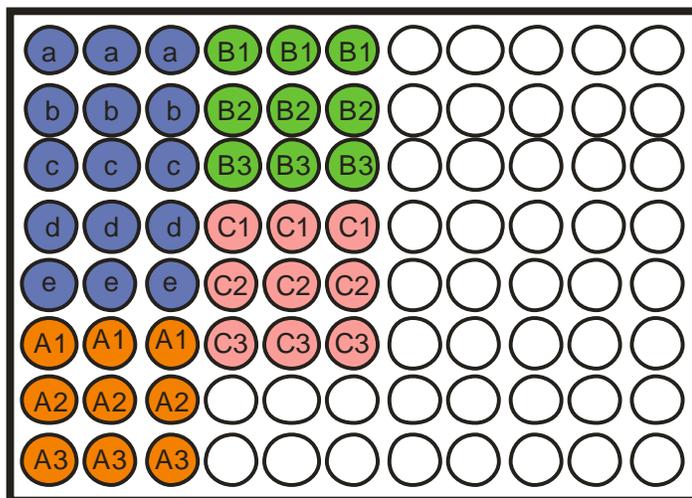


Figura 17. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro de microplaca.

Pozo a, b, c, d, e	Curva de calibración
Pozo A1, A2, A3	Dieta Control
Pozo B1, B2, B3	Dieta Ronozyme® P5000
Pozo C1, C2, C3	Dieta FTE II

Curva de calibración:

Para hacer la lectura de la curva en el espectrofotómetro se toman 220 μ l de la solución resultante de cada tubo y se inyecta en una microplaca de lector de ELISA por triplicado para cada tubo. Al final se realiza una regresión lineal de las lecturas obtenidas y se verifica el patrón de la curva (Figura 18).

Concentración μ M	Estándar de fosfato ml	Agua destilada ml	Transferencia ml	Volumen total
1.000 (a)	10			5
0.500 (b)		5	5 de a	5
0.250 (c)		5	5 de b	5
0.125 (d)		5	5 de c	5
0.625 (e)		5	5 de d	5

Figura 18. Preparación de la curva de calibración.

ANEXO 8. Glosario

Afrechillo de trigo: Subproducto de la molienda del trigo obtenido en el proceso de elaboración de harina. Se compone por proporciones variables de tegumentos, capa de aleurona, germen y algo de endospermo.

Atractante: Sustancias a las que se les atribuye un estímulo de percepción y un estímulo en la ingestión del mismo.

Estadio A: Exoesqueleto muy blando. Ausencia en el consumo de alimento y absorción de grandes cantidades de agua.

Estadio B: El exoesqueleto muestra una consistencia apergaminada. Ausencia en el consumo de alimento y absorción de grandes cantidades de agua.

Estadio C: El exoesqueleto está completamente formado y es resistente. El animal se alimenta.

Estadio D: Inicio de secreción de nuevas capas cuticulares, coloración de la nueva cutícula. Reabsorción del antiguo exoesqueleto. Ausencia en el consumo de alimento y absorción de grandes cantidades de agua.

Estadio E: El animal sale de su antiguo exoesqueleto y lo abandona.

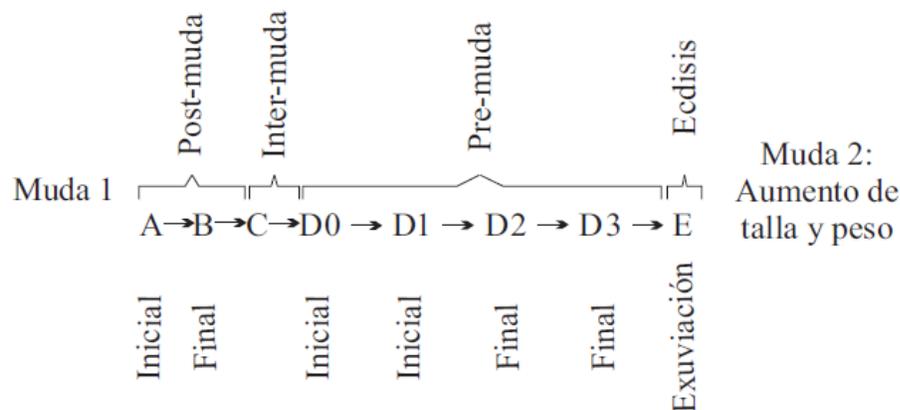


Figura 19. Estadios de muda del camarón.

Harina de krill: Harina obtenida a partir del crustáceo perteneciente a la fauna planctónica denominado “KRILL”. Como harina es una fuente rica en proteína.

Osmorregulación: Forma activa de regular la presión osmótica del medio interno del cuerpo para mantener la homeostasis de los líquidos del cuerpo. Es la regulación del agua al interior del cuerpo.

Schiller: Dispositivo que se utiliza para regular y controlar la temperatura de un sistema de cultivo de organismos acuáticos.

Sifoneo: Técnica mediante la cual se extraen desechos y agua del fondo de un acuario o estanque mediante una manguera unida a un dispositivo de boca ancha (en este caso se usó un embudo con papel filtro para retener la heces y dejar ir el agua del estanque).

Télico: Modificación de la parte ventral del cefalotórax de la hembra a la altura del tercer, cuarto y quinto par de pereopodos. En esta estructura es donde el macho deposita su espermatóforo. Hay dos tipos: el abierto y el cerrado.

Télico cerrado: Es la parte ventral del cefalotórax donde se observan receptáculos seminales cubiertos con mayor o menor grado por placas tergaes.

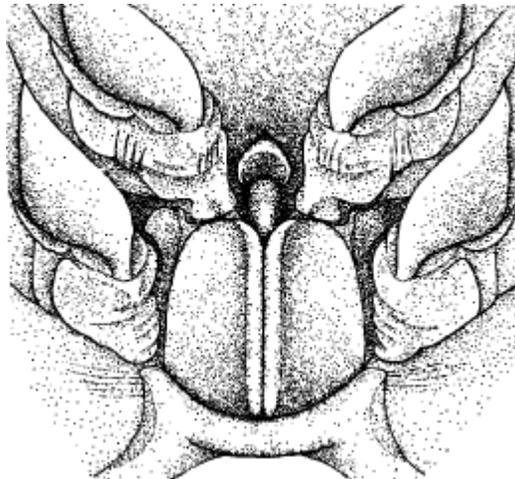


Figura 20. Télico cerrado en hembra de *Farfantepenaeus duorarum*

Télico abierto: El cefalotórax tiene una serie de depresiones, sedas y espinas, que permiten la adhesión del espermatóforo. Carecen de receptáculos seminales.

Vitelogénesis: Proceso de formación de los materiales de reserva del citoplasma del huevo.

FIGURAS

1	Distribución del camarón rosado del Golfo de México <i>Farfantepenaeus duorarum</i>	6
2	Esquema de un juvenil de camarón rosado del Golfo de México <i>Farfantepenaeus duorarum</i> señalando las tres regiones morfológicas.....	7
3	Ciclo de vida del camarón.....	9
4	Esquema del tracto digestivo del camarón.....	10
5	Esquema de la digestión del camarón.....	11
6	Área de estanquería.....	37
7	Dispositivo experimental.....	38
8	Diagrama del dispositivo experimental.....	39
9	Colecta de heces.....	41
10	Actividad de la Tripsina entre la dieta Control, Ronozyme® P5000 y FTE II.....	48
11	Actividad del la Quimotripsina entre la dieta Control, Ronozyme® P5000 y FTE II.....	50
12	Actividad de las Proteasas totales entre la dieta Control, Ronozyme® P5000 y FTE II.....	52

13	Actividad de la Glucosidasa entre la dieta Control, Ronozyme [®] P5000 y FTE II.....	54
14	Actividad de la α -amilasa entre la dieta Control, Ronozyme [®] P5000 y FTE II.....	55
15	Actividad del la Leucin amino-peptidasa entre la dieta Control, Ronozyme [®] P5000 y FTE II.....	57
16	Actividad de la Carboxipeptidasa B entre la dieta Control, Ronozyme [®] P5000 y FTE II.....	59
17	Lectura de las muestras en el espectrofotómetro de microplaca.....	96
18	Preparación de la curva de calibración.....	97
19	Estadios de muda del camarón.....	98
20	Télico cerrado en hembra de <i>Farfantepenaeus duorarum</i>	99

CUADROS

1	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CAMARÓN ROSADO DEL GOLFO DE MÉXICO <i>Farfantepenaeus duorarum</i>	5
2	PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD APARENTE EN CAMARONES USANDO COMO MARCADOR INERTE EL ÓXIDO DE CROMO Y LA ZEOLITA.....	23
3	COMPOSICIÓN DE DIETAS PARA CAMARÓN ROSADO DEL GOLFO DE MÉXICO <i>Farfantepenaeus duorarum</i>	40
4	COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD APARENTE EN MATERIA SECA, FÓSFORO Y PROTEÍNA DE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	46
5	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA TRIPSINA.....	47
6	ANOVA BIFACTORIAL DE LA TRIPSINA ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	47
7	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA POR DIETAS.....	48
8	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA QUIMOTRIPSINA.	49
9	ANOVA BIFACTORIAL DE LA QUIMOTRIPSINA ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	49
10	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LA QUIMOTRIPSINA POR DIETAS.	50
11	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS PROTEASAS TOTALES.	51

12	ANOVA BIFACTORIAL DE LAS PROTEASAS TOTALES ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	51
13	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS TOTALES POR DIETAS.	52
14	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA GLUCOSIDASA.....	53
15	ANOVA BIFACTORIAL DE LA GLUCOSIDASA ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	53
16	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA α -AMILASA.	54
17	ANOVA BIFACTORIAL DE LA α -AMILASA ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	55
18	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA LEUCIN AMINO-PEPTIDASA.....	56
19	ANOVA BIFACTORIAL DE LA LEUCIN AMINO-PEPTIDASA ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	56
20	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CARBOXIPEPTIDASA B.	57
21	ANOVA BIFACTORIAL DE LA CARBOXIPEPTIDASA B ENTRE LA DIETA CONTROL, RONOZYME [®] P5000 Y FTE II.....	58
22	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD DE LA CARBOXIPEPTIDASA B POR DIETAS.	58
23	PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS REGISTRADOS DURANTE EL EXPERIMENTO.....	60
24	COEFICIENTE DIARIO DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA.....	61

25	VALORES DE DIGESTIBILIDAD APARENTE DE MATERIA SECA Y PROTEINA OBTENIDOS EN EL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO <i>Litopenaeus vannamei</i> POR DIFERENTES AUTORES.....	66
-----------	---	----