



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



EFECTO DE LA FITASA EN DIETAS BASADAS EN
PROTEÍNA VEGETAL EN LA FISIOLÓGÍA DIGESTIVA, EL
CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE *Farfantepenaeus*
duorarum (Burkenroad, 1939).

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

BIOL. JORGE LUIS GAMBOA ÁLVAREZ

Director de Tesis: DRA. MARTHA G. GAXIOLA CORTES

Comité Tutorial: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
DRA. MARINA EZQUERRA BRAUER
DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN
DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

Mérida Yuc., 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

EFFECTO DE LA FITASA EN DIETAS BASADAS EN PROTEÍNA VEGETAL EN LA
FISIOLOGÍA DIGESTIVA, EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE
Farfantepenaeus duorarum (Burkenroad, 1939).

COMITÉ DE TESIS

Dr. Edgar Zenteno Galindo
Presidente

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes
Secretario

Dra. Josafat Marina Ezquerra Brauer
Vocal

Dra. Martha Guerrero Olazarán
Suplente

Dra. Ruth Pedroza Islas
Suplente

EFFECTO DE LA FITASA EN DIETAS BASADAS EN PROTEÍNA VEGETAL EN LA
FISIOLOGÍA DIGESTIVA, EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE
Farfantepenaeus duorarum (Burkenroad, 1939)

COMITÉ DE TESIS

Dr. Pedro Gallardo Espinoza
Asesor Externo

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, UNAM con sede en Sisal, Yucatán, con el apoyo financiero del CONACYT-CIENCIA BÁSICA- 60824, bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés.

Se agradece el apoyo técnico de: Miguel Arévalo, Adriana Paredes, Manuel Valenzuela, Gabriela Palomino, Gabriel Taboada y Ariadna Sánchez, técnicos académicos del Programa Camarón y el Laboratorio Central de la Unidad Ciencias. A Koritntia López y el Dr. Sergio Rodríguez de la Unidad Química de la UNAM, por los análisis de química analítica. A la Dra. Martha Guerrero del a UANL, por aportar la fitasa recombinante de origen bacteriano. A DSM por la donación de la enzima Ronozyme y las premezclas de vitaminas y minerales.

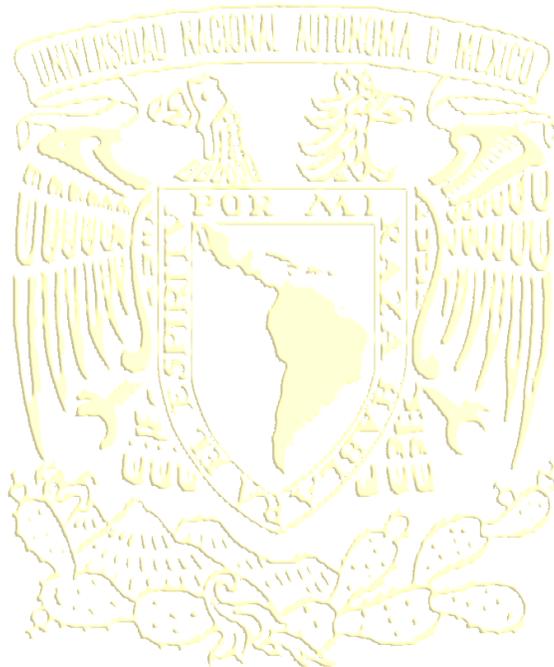
Agradezco al Consejo Nacional De Ciencias Y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (226138) durante el periodo 2009-2011.

DEDICATORIAS

Durante lo largo de mi vida he conocido a varias personas que han llegado a formar parte de mí, que me han aconsejado, brindado su amistad incondicional, su compañía y sobre todo consejos valiosos por lo cual he llegado a ser lo que soy, aunque algunas no se encuentren conmigo pero sé que donde estén, siempre estarán presente en mí.

A mis padres Jacinto Gamboa y Martha Álvarez, porque aun no estando físicamente conmigo, siempre me han brindado su apoyo y lo más importante su amor, aunque algunas veces los he hecho molestar, saben que siempre los voy a querer.

Y sobre todo le dedico esta tesis al ser más especial, a ti Señor porque hiciste realidad este sueño, por tener ese amor tan infinito, Gracias.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de la culminación de este proyecto.

A la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, por la paciencia y ayuda en este trabajo, por sus consejos, por creer en mí, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo, por sus conocimientos y por haberlos compartido conmigo.

A la Dra. Marina Ezquerro Brauer, por haberme dado su confianza, amistad y apoyo.

A la Dra. Martha Guerrero Olazarán y el Dr. Pedro Gallardo Espinoza, por sus asesorías, su paciencia y sus respuestas a incontables preguntas y por su amistad.

A Celio Hernández por su colaboración en la realización del experimento, aunque pasamos momentos difíciles, siempre hubo esperanza que nos motivo a conseguir las metas.

A mis compañeros y amigos, Carlos Maldonado, Alejandra Arbeláez, Sara Ortiz, Reyna Calvo, David Gutiérrez, Adriana Da silva, Wilberth Concha, Paul Ortega y Jorge Puch (Chito), por su amistad y su aportación de cada uno de ellos en esta tesis, por los momentos divertidos que hemos pasado juntos y se que podre contar con ellos siempre.

A Paty Can y Ana Hernández por creer en mí, su empuje y palabras de ánimos durante la maestría y por estos años que me han brindado su hermosa y valiosa amistad, y aunque me encuentre en situaciones difíciles siempre contare con ellas.

A todos, mis sinceros Agradecimientos.....

Jorge Gamboa



RESUMEN

Las pastas de canola y soya han sido evaluadas como fuentes de proteína en sustitución de la harina de pescado, para la engorda de camarones, con la finalidad de reducir los costos de producción del alimento. Sin embargo, la presencia de ácido fítico en estas proteínas vegetales se considera como un factor antinutricional por su acción quelante de minerales indispensables en la nutrición de los camarones. Por ello, se planteó como objetivo, evaluar el efecto de la enzima fitasa (cuya función es hidrolizar el ácido fítico) sobre la digestibilidad aparente de fósforo, la actividad de las enzimas digestivas, el crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *F. duorarum* alimentados con dietas formuladas con una mezcla de pasta de soya y de canola. Se pretendió que la enzima actuara ya sea durante la digestión o durante el procesamiento del alimento, hidrolizando el ácido fítico en las dietas. Se realizaron 2 experimentos: (1) para evaluar el crecimiento, supervivencia y actividad enzimática, utilizando 80 juveniles ($0.66 \pm 0.22\text{g}$) de *Farfantepenaeus duorarum*, en un diseño experimental completamente aleatorizado, con tres tratamientos (dieta vegetal control "DC", dieta vegetal fitasa Ronozyme "DVFR" y dieta vegetal fitasa Experimental "DVFP", con 3 repeticiones cada una);(2) para evaluar el efecto de la digestibilidad aparente de fósforo (DAF), materia seca (DAM) y proteína (DAP), donde se usaron 63 juveniles de *F. duorarum* ($11.46 \pm 2.39\text{g}$) con una densidad de 7 camarones/tanque; y se colectaron heces durante 60 días, obteniendo 2g/tanque. Los resultados sugieren que un pretratamiento de las harinas (soya y canola) con fitasa "PhyC-R" favoreció el crecimiento en camarones juveniles de *F. duorarum*. Así mismo, la actividad enzimática de tripsina y quimotripsina del hepatopáncreas de juveniles camarón *F. duorarum* no fue afectada por la inclusión fitasa (Ronozyme/ PhyC-r). La inclusión de fitasa (Ronozyme/FTEII) permitió una mayor digestibilidad de los nutrientes de la dieta y facilitó la biodisponibilidad de fósforo y proteínas que forman complejos con el fitato, por lo que se consideró que la dieta pretratada con fitasa fue adecuada para el cultivo de juveniles de *F. duorarum*. En conjunto los resultados de este estudio permitieron

evidenciar el potencial que tienen las fitasas de origen exógeno en la formulación de alimentos.

INDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIAS.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE TABLAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS.....	3
III. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	4
IV. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Distribución de <i>F. duorarum</i>	5
4.2 Hábitos alimenticios.....	6
4.3 Sustitución de harina de pescado.....	7
4.4 Falta de atractabilidad.....	10
4.4.1 Atrayentes.....	11
4.5 Factores antinutricionales.....	13
4.5.1 Ácido fítico.....	13
4.5.2 Características del ácido fítico.....	14
4.5.3 Generalidades de la fitasa.....	16
4.5.4 Utilización de la fitasa en alimentos.....	17
4.6 Coeficiente de Digestibilidad Aparente.....	19
V. METODOLOGÍA.....	22
5.1 Experimento 1. Evaluación de dos tipos de inclusión de fitasa.....	23
5.1.1 Diseño experimental.....	23
5.1.2 Composición de las dietas.....	23

5.1.3 Método de elaboración de las dietas experimentales.	24
5.1.4 Condiciones de manejo de los organismos.....	26
5.1.5 Alimentación.....	26
5.1.6 Parámetros evaluados.....	26
5.1.6.1 Crecimiento y supervivencia.	26
5.1.6.2 Actividad enzimática	27
5.1.7 Análisis estadísticos	28
5.2 Experimento 2. Efecto en la digestibilidad aparente	28
5.2.1 Diseño experimental.....	28
5.2.2 Composición de las dietas.	29
5.2.3 Método de elaboración de las dietas experimentales.	30
5.2.4 Condiciones de manejo de los organismos.....	31
5.2.5 Alimentación	31
5.2.6 Técnica de colección de heces.....	31
5.2.7 Parámetros a evaluar.	32
5.2.7.1 Determinación de la digestibilidad aparente.....	32
5.2.7.2 Composición química proximal y aminoacídica.....	33
5.2.8 Análisis estadísticos	34
VI. RESULTADOS	35
6.1 Experimento 1. Evaluación de dos tipos de inclusión de fitasa.....	35
6.1.1 Crecimiento y supervivencia	35
6.1.2 Proteína soluble, actividad específica de la tripsina y la quimotripsina.....	36
6.2 Experimento 2. Efecto en la digestibilidad aparente.	38
6.2.1 Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA)	38
6.2.2 Composición química proximal (CQP) y aminoacídica (CQaa).....	39
6.2.3 Integración de digestibilidad aparente y actividad enzimática.....	41
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIONES	47
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	49
X. ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Promedios de actividad de la tripsina vs CDA Proteína (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Marcadores usados en digestibilidad aparente.....	21
2	Composición de las dietas experimentales con 40% de proteína.....	24
3	Composición de las dietas experimentales con 40% de proteína	29
4	Crecimiento de <i>F. duorarum</i>	35
5	ANDEVA de bioensayo de crecimiento <i>F. duorarum</i>	35
6	Supervivencia de <i>F. duorarum</i>	36
7	Promedios de concentración de proteína soluble.....	36
8	Promedios de actividad de la tripsina	37
9	Promedios de actividad de la quimotripsina	38
10	Coefficientes de digestibilidad aparente (CDA)	38
11	Composición proximal de las dietas.....	39
12	Análisis de aminoácidos.....	39
13	Cómputo químico (CQ) de aminoácidos.....	40

ABREVIATURAS

ANDEVA	Análisis de varianza
AIA	Acid Insoluble Ash (cenizas insolubles en ácido)
CDA Proteína	Coefficiente de digestibilidad aparente de proteína
CDA Fósforo	Coefficiente de digestibilidad aparente de fósforo
CDAMS	Coefficiente de digestibilidad aparente de materia seca
°C	Grados centígrados
C.P.	Concentrado proteico
U/g GD	Unidades por gramo de glándula digestiva
g	Gramos
L	Litros
h	Horas
Cr₂O₃	Óxido de cromo
Ca	Calcio
P	Fósforo
Mg	Magnesio
AF	Ácido fítico
Pl	Postlarvas
Asp	Ácido aspártico
Ser	Serina
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
Arg	Arginina
Thr	Treonina
Ala	Alanina
Pro	Prolina
Tyr	Tirosina

Val	Valina
Met	Metinina
Lys	Lisina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Phe	Fenilalanina
Trip	Triptófano
CQ	Cómputo químico
AQP	Análisis Químico Proximal
M	Materia seca
H	Humedad
C	Cenizas
PC	Proteína cruda
EE	Extracto etéreo
FC	Fibra cruda
ELN	Extracto libre de nitrógeno

I. INTRODUCCIÓN

La industria acuícola ha tenido un incremento considerable en los últimos 50 años. Sin embargo, esta actividad sigue siendo dependiente de la pesca de captura marina para el aprovisionamiento de insumos claves en la dieta de los organismos cultivados (Tacón, 2008). Sector que por el contrario, cesó de crecer a mediados de la década de 1980, situación que se ha visto agravada por los precios altos del combustible, y situación inestable de los recursos de reserva, que en el caso de muchas especies ha alcanzado niveles críticos (FAO, 2008), Por otra parte, uno de los insumos más importantes en la elaboración de los alimentos para especies acuícolas es la harina de pescado, cuyos costos han ido en aumento, obligando a buscar fuentes alternas como las proteínas vegetal (Tacón y Foster, 2000; Hardy, 2008) provenientes de la canola, el trigo, el lupino y la harina de soya (*Glycine maxima*), entre otras, siendo esta última la más recurrida al contar con un alto perfil nutricional y ser de más bajo costo que la harina de pescado (Hardy, 1999).

Sin embargo, se ha observado que cuando el alimento es elaborado con fuentes de proteína vegetal disminuye el consumo, debido a la falta de atrayentes y presencia de fitatos, que disminuyen la biodisponibilidad de ciertos minerales de importancia nutricional (Lee y Meyer, 1996; Mendoza *et al.*, 2000; Mendoza, 2003), y el uso de fitasas de origen endógeno o exógeno como una estrategia para la utilización de fósforo fítico, que mediante la hidrólisis del ácido fítico (AF) durante la digestión o durante el procesamiento del alimento se mejore en proporciones variables la absorción y retención del P, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y aminoácidos (Rebollar y Mateos, 1999; Gómez-Villalva, 2005).

Además si consideramos que el alimento puede representar del 50 al 60% del costo total de producción, cualquier mejoría en su uso, formulación o proceso tiene un impacto económico inmediato y positivo (Devresse, B. 2000).

Por ello se diseñó el presente trabajo, para demostrar mediante el efecto sobre el crecimiento, la actividad enzimática y la digestibilidad aparente, si es factible una sustitución del 95% de harina de pescado en alimentos balanceados para juveniles de camarón rosado del Golfo de México *F. duorarum*, con fuentes de proteína vegetal, tales como las pastas de soya y canola, pretratadas con una enzima fitasa exógena, y empleando como atrayente ensilado de pescado. La metodología para el presente estudio se dividió en 2 experimentos: 1) bioensayo en crecimiento, supervivencia y actividad enzimática, 2) bioensayos de digestibilidad aparente.

II. HIPÓTESIS

Los camarones peneidos no poseen una enzima endógena capaz de hidrolizar el ácido fítico presente en las fuentes de proteína vegetal, tales como la pasta de canola y la pasta de soya. El ácido fítico ejerce una acción quelante de minerales como el calcio, cuya ausencia impide la activación de enzimas digestivas, como la tripsina. Por lo tanto la adición de la fitasa exógena (Ronozyme o PhyC-R/FTE II) eliminará el efecto quelante del fitato, lo cual producirá una mayor actividad de la tripsina del camarón rosado *F. duorarum*. Adicionalmente la acción hidrolítica de la fitasa exógena, liberará los componentes del fitato (inositol y grupos fosfato) que podrán ser empleados en el metabolismo de los juveniles del camarón rosado, lo cual podrá ser evaluado a través de la medición de la digestibilidad aparente del fósforo.

III. OBJETIVOS

3.1.-Objetivo general

Evaluar el efecto de la enzima fitasa exógena sobre la digestibilidad aparente de fósforo, la actividad de las enzimas digestivas, el crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *F. duorarum* alimentados con dietas formuladas con una mezcla de pasta de soya y de canola.

3.2.-Objetivos particulares

- a) Evaluar el efecto en el crecimiento, la supervivencia y la actividad de las enzimas digestivas de los juveniles de *F. duorarum* alimentados con alimentos ricos en proteína vegetal, en los que se incluyeron dos fitasas: un pretratamiento de las harinas vegetales con una fitasa experimental (PhyC-R) y la inclusión directa de una fitasa comercial (Ronozyme P5000 CT) en el alimento balanceado.
- b) Determinar la digestibilidad aparente de fósforo, materia seca y proteína, de los juveniles de *F. duorarum* alimentados con alimentos ricos en proteína a vegetal en los que se han incluido los dos tipos de fitasa: un pretratamiento de las harinas vegetales con una fitasa experimental (FTEII) y la inclusión directa de una fitasa comercial (Ronozyme P5000 CT).
- c) Identificar mediante el cómputo químico, los aminoácidos limitantes en las dietas experimentales, usando como proteína patrón el músculo abdominal del camarón rosado.

IV. ANTECEDENTES

La camaronicultura mexicana ha tenido un rápido y explosivo crecimiento de alrededor de 17% en los últimos años y se espera un crecimiento sostenido en los próximos 10 años (Martínez-Córdoba *et al.*, 2009), ocupando el segundo lugar en América Latina después de Ecuador, que es el cuarto productor mundial de este crustáceo (FAO, 2008).

En nuestro país se cuenta con seis especies que tienen potencial de cultivo, cuatro de ellas pertenecientes al género *Farfantepenaeus* (*F. californiensis*, *F. aztecus*, *F. duorarum* y *F. brasiliensis*) y dos del género *Litopenaeus* (*L. vannamei* y *L. stylirostris*) (Diario Oficial, 2006). No obstante, en México la acuicultura formal tiene una corta historia, teniendo un inicio en los años setenta en el litoral del Pacífico, donde principalmente se cultiva el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, que es el crustáceo de mayor importancia nacional e internacional (López-Téllez *et al.*, 2000).

Sin embargo, debido a la globalización del cultivo del camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*), han aumentado los riesgos implícitos en la transfaunación, como es la propagación de enfermedades al medio natural, pérdida en la viabilidad genética de las especies nativas o su desplazamiento (Méndez *et al.*, 2008). Por ello es importante estudiar las especies nativas del Golfo de México y Mar Caribe con potencial de cultivo, como el camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) el cual, es motivo de estudio en Brasil, Cuba, Estados Unidos y México (Gracia, 1995).

El camarón rosado es considerado una especie de alto valor desde el punto de vista comercial en el Golfo de México, donde se ha desarrollado una pesquería, desde la década de 1950, la cual representó más del 70% de la producción de camarón del Golfo de México (Gracia, 1995). En el 2006, el Diario Oficial reporta que la producción anual exhibe una persistente tendencia a la baja, teniendo como resultado un fuerte decremento de las capturas, registrando una captura promedio alrededor de las 500 toneladas de colas, siendo

evidente una tendencia hacia el colapso de la pesquería (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2000; Diario Oficial, 2006).

Por ello, diversos investigadores empezaron a realizar estudios sobre el cultivo de camarón rosado, para poder ofrecer el beneficio invaluable del uso racional de una especie representativa de nuestra biodiversidad de la zona (López-Téllez *et al.*, 2000).

4.1.- Distribución de *F. duorarum*.

Los camarones de *F. duorarum* se distribuyen desde la Bahía de Chesapeake a la Florida, el Golfo de México y hasta Isla Mujeres, Quintana Roo. Sus mayores concentraciones en México se localizan desde un metro de profundidad en la costa norte del estado de Campeche, hasta los 70 m en la región de la Sonda de Campeche, donde se registra el 31% de la captura del litoral del Golfo de México (Diario Oficial, 2006).

Esta especie, en etapa juvenil se presenta en una proporción variable en la mayor parte de la costa y en lagunas costeras del Golfo de México. La mayor concentración de esta especie está ubicada entre las aguas protegidas y costas de Campeche y Yucatán, desde la porción noreste de la Laguna de Términos y el estero de Sabancuy, hasta Isla Arena y Celestún. Éstas son las áreas de crianza más importante para el camarón rosado en aguas del Golfo de México. Se tienen registros de que las mayores poblaciones de juveniles se encuentran principalmente en dos localidades: el estero de Sabancuy y Champotón (Gracia *et al.*, 1997).

4.2.- Hábitos alimenticios.

Los estudios sobre los hábitos alimenticios han demostrado que los camarones peneidos son omnívoros, y que algunas especies presentan tendencias hacia la carnivoría o

a la herbivoría, dependiendo de la disponibilidad de alimento y de la estacionalidad (Tacón y Akiyama, 1997) por lo que presentan una amplia gama de enzimas digestivas, tales como proteinasas, endoproteinasas, exoproteinasas, esterases no específicas, lipasas, amilasa, maltasa, sucrasa, quitinasa, celulasa (Lovett y Felder, 1990), permitiendo así la implementación de alimentos a base de fuentes proteicas de origen vegetal (García *et al.*, 1998).

En específico, *F. duorarum* es considerado como una especie de hábitos omnívoros en etapa juvenil, tendiendo hacia la carnivoría en etapa adulta (Schwamborn y Criales, 2000).

En estudios de nutrición con *F. duorarum*, Aragón *et al.*, (2011) reportan la presencia de α -amilasa en juveniles de *F. duorarum* como un mecanismo compensatorio para la utilización de carbohidratos de origen vegetal. Por otro lado, Gaxiola (1994) determinó que el requerimiento de proteína en postlarvas tempranas es del 50%. Así mismo, Rosas *et al.* (1995) determinaron que en los estadios de postlarvas tardías y juveniles tempranos se requiere de un 40% de proteína en la dieta para obtener buenas tasas de crecimiento.

Ramos *et al.* (2001), señalan que se requiere de una dieta que no sólo supla los requerimientos cualitativos y cuantitativos de nutrientes, sino que también debe ser ingerida, digerida y absorbida en la cantidad adecuada.

4.3.- Sustitución de harina de pescado.

La industria acuícola ha tenido un incremento considerable en los últimos 50 años. Desde una producción de menos de un millón de toneladas a comienzos de la década de 1950, hasta una producción de 51,7 millones de toneladas en 2006. Esto significa que la

acuicultura sigue creciendo a un ritmo mayor que otros sectores de producción animal (FAO, 2008). Sin embargo, la industria acuícola sigue siendo dependiente de la pesca de captura marina para el aprovisionamiento de insumos claves en la dieta de los organismos cultivados (Tacón, 2008).

Es por esto que se están dedicando importantes esfuerzos de investigación para sustituir este ingrediente por fuentes de proteínas alternativas de origen vegetal (Barros *et al.*, 2002) como: canola, trigo, lupino y la harina de soya (*Glycine maxima*), siendo esta última la más recurrida al contar con un alto perfil nutricional y ser de más bajo costo que la harina de pescado (Hardy, 1999).

La harina de soya desengrasada ha sido utilizada con éxito en la alimentación de organismos acuáticos y específicamente de camarones peneidos, al contar con un nivel de proteína de 40-50% (Carrillo, 2007).

En particular, en lo que se refiere a la nutrición de los camarones peneidos, estudios realizados por Colvin y Brand (1977) reportaron haber obtenido una mayor tasa de crecimiento y conversión alimenticia en juveniles de *F. californiensis* con un 50% de sustitución a la harina de pescado por pasta de soya. Así mismo, Fenucci *et al.*, (1982) reportaron un efecto positivo de la sustitución del 50% de harina de calamar por pasta de soya en *L. setiferus* y *L. stylirostris*, al presentar una alta tasa en el crecimiento, una mayor sobrevivencia y un mejor factor de conversión. Por otro lado, Dominy y Lim (1993) realizaron estudios con una inclusión del 40% de soya en alimentos balanceados para *L. vannamei*, no obteniendo diferencias significativas en los tratamientos. En estudios de Lawrence *et al.* (1986) con una inclusión del 40 y 50% de soya en dietas de laboratorio, no se determinaron diferencias significativas en el crecimiento y sobrevivencia de varias especies de camarón (*Penaeus vannamei*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. stylirostris*). Estas investigaciones demuestran el potencial de la pasta de soya desengrasada, como un sustituto a la proteína de origen animal en diferentes niveles de inclusión en peneidos.

No obstante, Tacón *et al.* (1983) plantearon como alternativa a la deficiencia metionina y lisina en la harina de soya, el uso de otra fuente proteínica como la canola (*Brassica sp.*), que actuara como suplemento.

La harina de colza (canola) comprende entre el 50 y 60% del peso de la semilla, cuyo contenido de proteína oscila entre 37 y 40%. Por la calidad de los aminoácidos que componen la proteína, su harina se puede comparar con la de soya (Molina y Lucas, 2007). La harina de canola está bien establecida como un ingrediente en alimento para salmón y trucha donde ha sido rutinariamente usada durante 20 años (Higgs *et al.*, 1996).

En la nutrición de peneidos, estudios realizados por Buchanan *et al.* (1997) en juveniles de *P. monodon* con una inclusión del 20% de canola, reflejan un efecto positivo al obtener mayor peso, en comparación con la dieta basal. Así mismo, Davis *et al.* (2002) reportan que una inclusión del 25% de canola en alimentos para juveniles de *Litopenaeus vannamei*, es factible al no presentar diferencias ($p>0.05$) en crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia. De igual manera, Cruz *et al.* (2001) no reportan diferencias significativas con el control en el crecimiento de juveniles de *L. stylirostris* alimentados con dietas con 30% de canola.

Estos estudios en conjunto permiten evidenciar el potencial de las fuentes de proteína vegetal como una alternativa a la sustitución parcial o total de la harina de pescado (proteína animal). Así mismo, otras investigaciones han demostrado que al menos en fase postlarval, *L. vannamei* no presenta diferencias significativas en supervivencia y crecimiento con alimentos balanceados con una sustitución hasta del 90% de proteína animal marina, por combinaciones de fuentes de proteína de origen vegetal (Jimenez-Yan, 2004; Cuzon *et al.*, 2003, Gaxiola *et al.*, 2005).

4.4.- Falta de atractabilidad.

Se ha observado, que cuando el alimento es elaborado con fuentes de proteína vegetal disminuye el consumo debido a la falta de atrayentes, considerándose definitiva su inclusión para garantizar la ingestión de los alimentos (Lee y Meyer, 1996; Mendoza *et al.*, 2000; Mendoza, 2003).

Debido a que el máximo beneficio de los alimentos solamente puede ser alcanzado si el alimento proporcionado es ingerido, la dieta presentada debe tener el balance correcto, la adecuada apariencia, textura, densidad y atracción (olor o sabor) para despertar una respuesta alimenticia óptima, principalmente para organismos que se alimentan por medio de la visión o por medio de quimiorreceptores (FAO, 1989).

La capacidad de percibir el alimento y detectar su sabor representa una estrategia energética, que permite minimizar el tiempo de búsqueda y maximizar la proporción neta de energía o de ingredientes ingeridos, estrategia que puede ser utilizada eficazmente, tanto en el diseño de los alimentos balanceados como en la forma de distribución (Cruz *et al.*, 1996).

En lo que respecta a los camarones, las sustancias atrayentes del alimento balanceado son detectadas por el olor (Mendoza *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000), por medio de las antenas y anténulas, apéndices encargados de la búsqueda y reconocimiento del alimento a través de quimiorreceptores llamados astetascos, que se encuentran en el flagelo lateral de las anténulas, comunicados por el nervio antenular al lóbulo olfatorio del protocerebro de los crustáceos. Los movimientos de las antenas tienen como función aumentar la exposición de los astetascos a los químicos propiciando la circulación del agua (Cruz *et al.*, 1996).

El camarón, una vez que se ha dirigido al alimento, lo degusta con los receptores presentes en pereopodos y apéndices bucales, dando como respuesta la aceptación o el

rechazo del alimento (Mendoza *et al.*, 1996). Los quimiorreceptores son sensibles a mezclas de moléculas disueltas en el agua liberadas de los alimentos naturales o artificiales. Estos compuestos son moléculas muy solubles en agua y son de bajo peso molecular (inferior a 700 Da) como: aminoácidos (glicina, arginina, glutamina, alanina), taurina, compuestos cuaternarios de amonio, trimetilamina, betaína, nucleótidos, nucleósidos, ácidos grasos, compuestos lipídicos, aminas biogénicas y algunos azúcares (Smith *et al.*, 2005; Galindo, 2007). De hecho, muchas de estas sustancias se liberan de los organismos cuando mueren por descomposición de las proteínas, siendo éste uno de los mecanismos como un detritívoro reconoce a su presa (Cruz *et al.*, 1996).

4.4.1.- Atrayentes.

Los atrayentes son ingredientes químicos, sintéticos o naturales que contienen sustancias que promueven una respuesta óptima hacia el alimento en peces y camarones, en el sentido de propiciar una rápida localización y un aumento significativo del consumo (Galindo, 2007).

Galicia (2003) menciona que se ha identificado la importancia del uso de los atrayentes como una estrategia en la disminución de los costos de producción de las empresas acuícolas y, por lo tanto, con una mayor rentabilidad, por la necesidad de optimizar la tasa de conversión del alimento y de reducir los desperdicios.

Existen una gran variedad de atrayentes, como es el ensilado de pescado, el cual constituye una alternativa usada en dietas de animales tales como porcinos, bovinos, aves, animales de peletería y en la acuicultura. Esta modalidad ha sido implementada en muchos países europeos, como así también en América Latina. Gohl (1982) refiere que en la obtención del ensilado de pescado puede utilizarse todo tipo de pescado y desperdicios de

éste. El principio es que el ácido disminuya el pH y evite la putrefacción bacteriológica del pescado, mientras que las enzimas presentes empiecen a licuarlo (Mattos *et al.*, 2003).

Los ensilados pueden ser biológicos y químicos. Los primeros son aquellos que a la molienda del pescado se les adiciona hidratos de carbono (ej. melaza) y microorganismos (*Lactobacillus plantarum*, *Streptococos*, *Candida lipolítica*, etc.). En el caso de los químicos se utilizan diferentes ácidos, tales como: ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico o mezclas de acético. El resultado final en ambos casos es un descenso del pH (Copes, 2006).

Bertullo (1989) y Miranda *et al.* (2001), mencionan que una de las características del ensilado es que la proteína se hidroliza entre 75-85%, estando el 60% bajo forma de polipéptidos y el 40% como aminoácidos libres (esenciales y no esenciales), forma asimilable en animales monogástricos.

El ensilado de pescado mantiene el valor nutritivo de la materia prima, en comparación con el proceso de harina de pescado (Miranda *et al.*, 2001). La FAO (1989) indica que durante el proceso de elaboración de harina de pescado se llega a elevadas temperaturas (120-150°C), lo que tiene un efecto perjudicial sobre la calidad de la misma, ya que el calor produce una importante disminución del valor biológico de las proteínas por racemización de aminoácidos (lisina), destrucción de vitaminas y pérdidas del 30% de los iones cloro, sodio y potasio, y del 15% al 35% de iones magnesio y cobre.

En la nutrición de los camarones peneidos, los estudios realizados por Balsine *et al.*, (2003) determinaron que un nivel de inclusión del 16% de ensilado de pescado en la dieta, obtenido por el método de auto-fermentación anaerobia con melaza de caña, resultó apropiado para ser utilizado como sustituto de la harina de pescado en la formulación de las dietas para camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*), al obtener una mayor ganancia de peso, en comparación con la dieta control. Así mismo, un estudio de González *et al.*, (2007) concluyó que una incorporación del 15% de ensilado de pescado no produjo

diferencias significativas con respecto al desarrollo y crecimiento de los camarones alimentados con la dieta comercial, por lo que el uso de ensilado de pescado puede ser alternativa en las dietas para *L. schmitti*.

Igualmente, el uso de atrayentes en los alimentos balanceados ha adquirido una enorme importancia ecológica, ya que mediante su utilización se puede reducir el desperdicio del alimento, lo cual influye directamente sobre la calidad del ambiente de cultivo, además de que permite la incorporación de fuentes proteicas vegetales (Lee y Meyer, 1997 en Galindo, 2007).

4.5.- Factores antinutricionales.

Esta nueva alternativa del uso de fuentes vegetales (soya y canola) en la industria acuícola presenta otro inconveniente, el cual está relacionado con los factores antinutricionales (antitripticos, antiquimotripticos, fitatos, lectinas y taninos) que afectan su valor nutricional y reducen la palatabilidad de los alimentos cuando se preparan con niveles altos de proteína vegetal (Carrillo *et al.*, 2007; Molina y Lucas, 2007). El tratamiento con calor (tostado, extrusión y peletización) inactivan o eliminan exitosamente estos antinutrientes, a excepción del fitato o ácido fítico (LimyAkiyama, 1993; Carrillo *et al.*, 2007).

4.5.1.- Ácido fítico.

El ácido fítico (AF) y sus sales (fitatos), constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en semillas de cereales y leguminosas (Ullah *et al.*, 2008), representando aproximadamente entre 50 y 80% del fósforo total del grano (Vohra *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006).

Sin embargo, debido a que el P en forma de AF no puede ser absorbido por los organismos con bajos niveles de fosfatasa endógena, en los sistemas de cultivos se suplementa con P inorgánico para cubrir los requerimientos de este mineral en los organismos. La importancia de cubrir los requerimientos de fósforo radica en que el P participa en la mayoría de las reacciones metabólicas, es componente básico de los ácidos nucleicos y ATP, es esencial para el crecimiento y el mantenimiento de la homeostasis mineral (Cabrera *et al.*, 2002). En situaciones normales, la mayor parte del P fítico aparece en las heces fecales de los camarones, lo que agudiza el problema de la eutrofización en ríos y sistemas estuarinos adyacentes a las granjas de engorda de camarón, provocando el crecimiento desmedido de cianobacterias (Lei, 2001). La presencia de estos organismos puede producirla hipoxia y muerte de organismos acuáticos, debido a que compiten por el oxígeno disuelto en el agua (Denstadli *et al.*, 2007).

4.5.2.- Características del ácido fítico.

El AF (hexafosfato de inositol, IP6) presenta una alta afinidad por componentes con carga positiva, debido a su alta carga negativa en un amplio rango de pH (Greiner y Konietzny, 2006). Por ello es considerado como un factor antinutricional por su acción quelante de minerales y la interacción con proteínas (Guerrero *et al.*, 2007) convirtiéndolos en no asimilables para el organismo bajo condiciones fisiológicas (Martínez *et al.*, 2002).

La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente. A valores de pH menores al punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas y de ésteres de fosfato aniónicos del AF, formándose un complejo binario (Selle *et al.*, 2000). A valores de pH mayor del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas es al igual que la del AF negativa, su interacción es repulsiva; sin embargo, la presencia de cationes divalentes

como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} , puede inducir la formación de un complejo ternario. A valores de pH elevado la interacción entre las proteínas y el AF disminuye, rompiendo la unión fitato-cación-proteína a valores de pH superiores a 10 (Gómez, 2005).

En lo que respecta a la interacción con cationes, ésta se debe exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato y pueden unirse bien a un solo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfatos de distintas moléculas de AF (Martínez *et al.*, 2003). Por otro lado, la inhibición de enzimas digestivas, tales como la pepsina, amilasa y tripsina, por el AF puede ser de naturaleza no específica de interacción proteína-fitato, siendo atribuible al secuestro de iones Ca, necesarios para la actividad de tripsina y α -amilasa, o por interacción con sustrato de esta enzima (Fennema, 2000). De igual manera, la inhibición de la proteasa puede ser en parte responsable por la reducción de la digestibilidad de la proteína (Greiner y Konietzny, 2006).

Núñez *et al.* (2009) señalaron, con evidencias *in vitro*, que los fitatos afectan negativamente la actividad de las enzimas proteolíticas pancreáticas de cerdos híbridos (Yorkshire X Landrace), con una reducción sustancial en la actividad de tripsina debido a la presencia de fitatos.

Los efectos adversos del AF dependen de un gran número de factores entre los que se destacan la concentración de AF, la fuerza de su unión con los diferentes minerales y la presencia de fitasa de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima.

4.5.3.- Generalidades de la fitasa.

La fitasas (myo-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6) hexaquisfosfato fosfohidrolasas, EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26 y EC 3.1.3.72), pertenece a un subgrupo de fosfatasas con un peso molecular estimado de 35-700 kDa, dependiendo la fuente de origen (Greiner y Konietzny, 2006). Esta es una de las primeras enzimas descritas que liberan fosfato inorgánico de los compuestos orgánicos fosforilados y está ampliamente distribuida en la naturaleza derivada de fuentes como plantas, animales y microorganismos (Fu *et al.*, 2007), las cuales catalizan la hidrólisis del ácido fítico a inositol y ortofosfato libre (Peers, 1953).

Las fitasas se clasifican en cuatro categorías principales: las fosfatasas ácidas de histidina (HAP), fitasas con estructura de hélice, cisteín fitasas y fitasas ácidas púrpuras (Lei *et al.*, 2007). Alternativamente, en base a la posición del carbón donde se inicia la remoción de los grupos fosfato en el fitato se clasifican en tres grupos: las 3-fitasas (también llamadas 1-fitasas, EC 3.1.3.8), 4-fitasas (también llamadas 6-fitasas, EC 3.1.3.26) y 5-fitasas (EC 3.1.3.72) de acuerdo a la base de datos ENZYME (disponible a través del servidor de proteómica ExPASy; <http://www.expasy.ch/enzyme>).

Vohra y Satyanarayana (2003) mencionan que las fitasas, de acuerdo al pH óptimo, se clasifican como fitasas ácidas (pH 3-5) y alcalinas (pH 8-10 aproximadamente).

La mayoría de las fitasas disponibles comercialmente son del tipo de las fosfatasas ácidas de histidina y derivadas de hongos (del género *Aspergillus*) y poseen actividad catalítica en el intervalo de pH de 2,5 a 6. Por otra parte, las fitasas con estructura de hélice son principalmente aisladas de especies *Bacillus* y son estructuralmente diferentes a las fitasas fúngicas, poseen alta estabilidad térmica, un pH óptimo en la gama neutral y una temperatura óptima de 55 a 70 ° C (Guerrero *et al.*, 2010).

Estas enzimas, al desfosforilar progresivamente al ácido fítico (6 radicales fosfatos), da lugar a productos de degradación variados: inositol penta-, tetra-, tri-, di-, y

monofosfatos. Estos tres últimos pueden atravesar la barrera intestinal, disminuyendo la capacidad de quelarse con los cationes y en particular la propiedad de formar los quelatos insolubles con zinc y calcio difícilmente absorbibles (Febles, 1998).

4.5.4.- Utilización de la fitasa en alimentos.

El uso de fitasas es una estrategia implementada para la utilización de fósforo fítico y otros nutrientes que se encuentran quelados por el ácido fítico “AF” (Martínez *et al.*, 2002). Las investigaciones con este tipo de enzimas (fitasas) iniciaron hace más de 87 años y fueron descubiertas por Suzuki *et al.*, (1907) comercializándose en Europa en 1993 por Gist-Brocades (Vohra y Satyanarayana, 2003).

La hidrólisis del AF durante la digestión o durante el procesamiento del alimento mediante la acción de las fitasas de origen endógeno o exógeno mejora en proporciones variables la absorción y retención del P, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y aminoácidos (Rebollar y Mateos, 1999; Gomez-Villalva, 2005), logrando de esta manera reducir hasta un 50% la problemática de la contaminación ambiental por minerales al utilizar las fitasas (Harter-Denis, 1999).

Gómez (2005) mencionó que las fitasas han sido utilizadas como aditivos en alimentos, teniendo un gran impacto en la industria al mejorar la utilización de dietas que contienen cereales como trigo, avena, cebada y maíz, lo que ha sido probado ampliamente para aves y cerdos.

Algunos estudios se han realizado con la finalidad de determinar la biodisponibilidad del fósforo de granos de cereales como componentes de las dietas para aves, a través de pruebas de crecimiento y mineralización del tejido óseo (Hernández *et al.*, 2006). Vallardi (2000) evaluó en gallinas de postura la adición de fitasa microbiana en

dietas bajas en fósforo, donde mejoró el porcentaje de postura, el índice de conversión alimenticia y el grosor de cascarón, logrando la disminución de la inclusión de nutrientes y abaratando la dieta, sin afectar los parámetros productivos y permitiendo conservar el medio ambiente.

En lo que respecta en la acuicultura, Nwana *et al.* (2007) reportaron que un pretratamiento de los alimentos con la fitasa en la carpa *Cyprinus carpio*, obtiene un incremento en la ganancia de peso, en la deposición de los minerales en el pez y en la eficiencia alimenticia al aumentar la digestibilidad aparente de minerales. Así mismo, Barros *et al.* (2002), en estudios de digestibilidad *in vitro* en alimentos para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, han demostrado que el tratamiento con fitasa aumentó tanto la digestibilidad de la proteína, como la retención de nitrógeno en alimentos balanceados a base de concentrado de soya, señalando que la adición de la enzima fitasa puede favorecer un aumento de la biodisponibilidad de la proteína, haciéndola más accesible a la acción de las enzimas digestivas.

En estudios con camarones peneidos, Divakaran y Ostrowski (1998) evaluaron la digestibilidad *in vitro* de la harina de soya, así como el efecto de la interacción entre la fitasa, la tripsina y α -amilasa de *Litopenaeus vannamei*, indicando que la actividad de las enzimas incrementa linealmente con el aumento de unidades de fitasa, la cual ejerce un efecto positivo en la hidrólisis de proteína. De igual manera, Biwsas *et al.* (2007) determinaron que al suplementar lisina y fitasa en dietas a base de soya se reduce la carga de nitrógeno y fósforo en los sistema de la cultivo de *Penaeus monodon*. Por otro lado, Civera y Guillaume (1989) evidencian un efecto negativo en el crecimiento, aumento en consumo de alimento y en la tasa de conversión alimentaria, al incorporar fósforo fítico en dietas para *Marsupenaeus japonicus* y *L. vannamei*. Así mismo, Davies y Lawrence (1993) determinan que al incorporar el 1.5% de fitato en dietas para *L. vannamei*, existe un disminución de niveles de Zn y P en el hepatopáncreas. De igual manera, Kumaraguru *et al.*, (2007) establecieron la presencia de anomalías en el hepatopáncreas (ampliación de vacuolas de las células B) de organismos de *P. monodon* alimentados con fuentes

vegetales, no tratadas para eliminar factores antinutricionales como: fitatos, inhibidores de tripsina, saponinas y compuestos polifenólicos.

El valor potencial de la fitasa en dietas con proteína vegetal, estriba en permitir que la fitasa reemplace la suplementación de fósforo inorgánico, reduciendo los costos de producción y minimizando la cantidad de fósforo excretado por los animales (hasta en un 50%) con lo cual se contribuye a la protección ambiental (Phillippy, 1999).

4.6.- Coeficiente de Digestibilidad Aparente.

La medición del Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA), no sólo provee una estimación de la disponibilidad de los nutrientes en los ingredientes y alimentos, sino que además es útil para la investigación de requerimientos nutricionales, selección de ingredientes con valor nutritivo, y formulación de dietas que minimicen la contaminación de agua de los sistemas de cultivo (Risque *et al.*, 2008). El principio implica el conocimiento de la ingestión y de la emisión fecal (Ortiz, 2009).

La medida puede realizarse por dos métodos: directo o indirecto. El método directo implica la medición total del alimento ingerido y de las heces emitidas, correspondientes a una o varias comidas. A diferencia, el método indirecto no implica la medición de la totalidad de la ingestión alimenticia ni de la emisión fecal, al basarse en la utilización de un marcador inerte no digestible y no absorbible incluido en los ingredientes alimentarios o incorporados en la dieta. El aumento de la concentración del marcador, en comparación con la de los nutrientes, permite cuantificar la desaparición de estos nutrientes y esta disminución se equipara a la absorción (Guillaume *et al.*, 2002).

Las técnicas a base de marcadores inertes han sido muy utilizadas en los estudios de digestibilidad (Smith *et al.*, 1985; Shiau *et al.*, 1992; Lee y Lawrence, 1997; Jones y De Silva, 1998; Smith y Tabrett, 2004).

Un marcador inerte debe ser totalmente indigestible, no absorbible, no debe tener ninguna acción farmacológica en la zona intestinal, debe pasar a través del intestino y ser evacuado a la misma tasa que otros contenidos del intestino. La cantidad de indicador ingerido y evacuado debe darse en períodos de tiempo iguales, el indicador no debe cambiar el sabor del alimento para no afectar su atractabilidad y debe medirse fácilmente por métodos químicos (Mendoza, 1993).

El marcador más ampliamente utilizado en camarones es el óxido de cromo (Goytortua *et al.*, 2006; Kumaraguru *et al.*, 2003; Cruz-Suárez *et al.*, 2001; Bautista *et al.*, 2003;). Sin embargo, varios autores han cuestionado su utilización. Leavit, (1985); Smith y Tabrett, (2004), consideran que no es válido en langosta americana (*Homarus americanus*) porque obtuvieron una diferencia en la tasa de paso de la materia orgánica en el intestino. Así mismo, Brown *et al.*, (1986) indican que en *Procambarus klarki*, el óxido de cromo ingerido pasó más rápidamente que la porción no ingerida de la dieta. Por su parte, Faucon, (1997) y Divakaran *et al.*, (2000) sugieren no utilizar el óxido de cromo teniendo en cuenta el riesgo de explosión durante su manejo, recomendando identificar otros marcadores diferentes al óxido de cromo en los estudios de digestibilidad en camarones.

El IFREMER de Tahití, Polinesia Francesa, ha trabajado con la zeolita como marcador inerte desde hace varios años. Así mismo, Faucon, (1997) utilizó el método de Cenizas Insoluble en Ácido (AIA) en estudios de digestibilidad de *L. stylirostris*. Este método tiene la particularidad de ser muy sencillo y no necesita equipos sofisticados.

Suárez (2008) presentó un resumen (Tabla 1) de los estudios de digestibilidad en camarones utilizando diferentes marcadores, y propuso la zeolita como marcador ya que cumple con las características requeridas para un marcador inerte.

Tabla 1. Marcadores usados comúnmente para determinar la Digestibilidad Aparente.

Especie	Digestibilidad Aparente	Marcador	Concentración del marcador	Ingrediente/nutriente en estudio
<i>L. vannamei</i> ¹	Materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos, energía	Cr ₂ O ₃	0.50%	Harina de cangrejo <i>Pleuroncodes planipes</i>
<i>Penaeus monodon</i> ²	Materia seca, proteína, lípidos, energía	Cr ₂ O ₃	0.50%	Lecitina de soya, aceite de pescado, aceite de girasol
<i>L. vannamei</i> ³	Materia seca, proteína, energía	Cr ₂ O ₃	1.00% 0.50%	Harina de soya
<i>L. vannamei</i> ⁴	Proteína	Cr ₂ O ₃	1.00%	Calamar seco por calor, hidrolizado de pescado
<i>L. vannamei</i> ⁵	Materia seca y energía	Cr ₂ O ₃	0.50%	Trigo, harina de maíz, harina de arroz, sorgo
<i>L. vannamei</i> ⁶	Proteína, lípidos, carbohidratos	Cr ₂ O ₃	0.50%	Almidón de maíz, almidón de papa y almidón de trigo
<i>L. stylirostris</i> ⁷	Materia seca, proteína y energía	Zeolita	3.00%	Alimentos para juveniles

¹Goytortúa *et al.*, (2006), ²Kumaraguru *et al.*, (2005), ³Divakaran *et al.*, (2000), ⁴Córdova y García (2001), Davis y Arnold (1995), ⁶Cousin *et al.*, (1996) ⁷Faucon (1997).

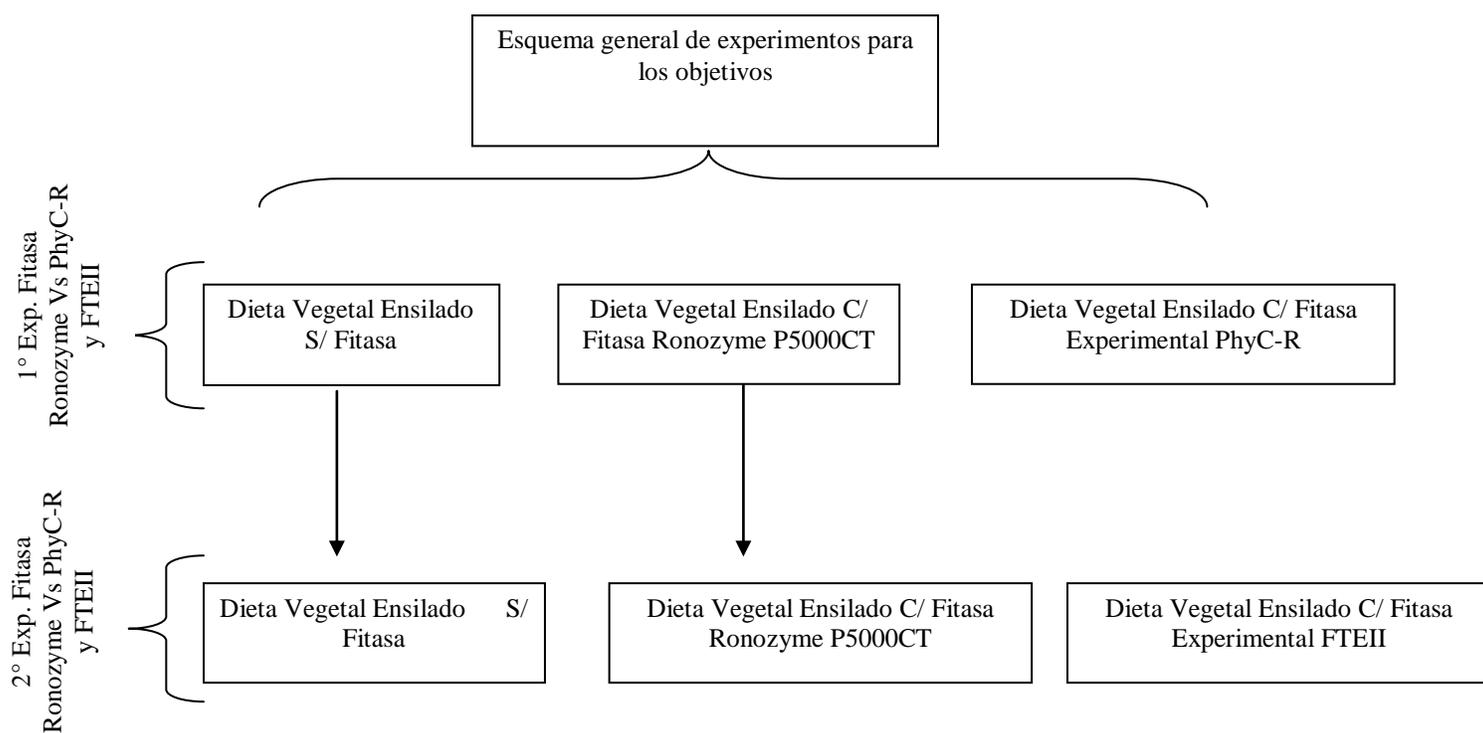
En la acuicultura, los estudios de digestibilidad tienen un triple objetivo: un mejor conocimiento de la utilización potencial de los nutrientes, una mejora en la calidad de los alimentos y, finalmente, una disminución de los desechos de origen alimentario de modo que se pueda preservar la calidad del medioambiente.

V. METODOLOGÍA

El presente estudio se dividió en dos fases experimentales:

*Experimento 1. Evaluación de dos tipos de inclusión de fitasa (pretratamiento con PhyC-R y la inclusión directa de Ronozyme P5000 CT) en dietas vegetales (soya y canola) de juveniles de camarón.

*Experimento 2. Evaluación de digestibilidad aparente por dos tipos de inclusión de fitasa (pretratamiento con FTEII y la inclusión directa de Ronozyme P5000 CT) en dietas vegetales (soya y canola) de juveniles de camarón.



5.1.- Experimento 1. Evaluación de dos tipos de inclusión de fitasa (pretratamiento con PhyC-R y la inclusión directa de Ronozyme P5000 CT) en dietas vegetales (soya y canola) de juveniles de camarón.

5.1.1.- Diseño experimental.

El diseño para el experimento fue completamente aleatorizado con 3 tratamientos y 3 réplicas/tratamiento, donde se usaron juveniles ($0.66 \pm 0.23\text{g}$) de *Farfantepenaeus duorarum*, los cuales se obtuvieron de un desove múltiple en las instalaciones de la UMDI, Sisal, Yucatán, México. Sus reproductores fueron alimentados con alimento fresco a base de mejillón y almejas. Los organismos del experimento (juveniles de *F. duorarum*) fueron mantenidos durante 60 días en un sistema de recirculación, en condiciones controladas de cultivo, (tanques de 400 L, a una densidad de 80 camarones/tanque) y alimentados con tres tratamientos: dieta vegetal con fitasa Ronozyme P5000 CT (DVFR), dieta vegetal con fitasa PhyC-R (DVFP), las cuales fueron comparadas contra una dieta control elaborada con fuentes de proteína vegetal sin inclusión de fitasa (DC).

5.1.2.- Composición de las dietas.

En la tabla 2, se presenta la formulación de las dietas empleadas durante este primer experimento: dieta vegetal con fitasa Ronozyme P5000 CT (DVFR), dieta vegetal con fitasa PhyC-R (DVFP), las cuales fueron comparadas contra una dieta control elaborada con fuentes de proteína vegetal sin inclusión de fitasa (DC).

Tabla 2. Composición de dietas experimentales con 40% de proteína (Experimento 1).

Materias Primas G/100g	Dieta Control (DC)	Dieta Vegetal Ronozyme (DVFR)	Dieta Vegetal PhyC-R (DVFP)
Ensilado de mero	5	5	5
Conc. Proteico de soya (PROFINE) ¹	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 bacalao ³	4	4	4
Lecitina de soya	1	1	1
Colesterol	0.5	0.5	0.5
Premix vitamínico y mineral ²	1.5	1.5	1.5
CMC	1	1	1
Zeolita ⁴	1.5	1.5	1.5
Ronozyme ⁵	-	0.05	-
Relleno	-	0.15	-
Total	100	100	100

¹Profine E, Central Soya Inc., 70.40% de proteína. ²Rovimix® Roche. ³Aceite de hígado de bacalao CEDROSA. ⁴zeolita 506 tierra de diatomeas lavadas con ácido, Celite Corporation. ⁵DSM Ronozyme P5000 CT (5000 U/g), PhyC-R (260 U/mL) 1600 U/kg de harina de soya y/o canola.

5.1.3.- Método de elaboración de las dietas experimentales.

Las dietas que se utilizaron en este experimento fueron fabricadas en el laboratorio de nutrición de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal), siguiendo el protocolo de elaboración de una dieta artificial para camarón, en donde los ingredientes secos se tamizaron a menos de 250 μ m y se mezclaron por 20 minutos, posteriormente se adicionaron los aceites, y se continuó el mezclado hasta formar la pasta, la cual fue pasada por un molino de rodillo sin fin para extruirla y formar los pellets, los cuales se secaron a 60°C durante 8 horas y luego se almacenaron a 4°C hasta ser empleados.

En este experimento, las harinas vegetales (canola, soya) para la dieta DVFP fueron pretratadas con fitasa PhyC-R, la cual es una forma recombinante de la fitasa de *B. subtilis* (PhyC-R) producida en *P. pastoris* (260 U/mL, con actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 9 y temperatura óptima de 55°C), en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Guerrero *et al.*, 2010). El pretratamiento se realizó incubando las harinas (100 g de soya y 245 g de canola) durante tres horas en agitación continua a 30°C en una dilución 1:20 (harina: agua), con la inclusión de 615 µL (160 U) y 1.5 mL (392 U) de fitasa (PhyC-R) en la harina de soya y harina de canola respectivamente, equivalentes a 1.6 U/g de harina vegetal tratada. Posteriormente estas diluciones fueron congeladas a -20°C para poder ser liofilizadas y así poder ser mezclada con los otros ingredientes secos para su posterior peletizado.

Por otro lado, la fitasa granular adicionada RONOZYME™P (CT) 5,000, es un nuevo producto de la casa comercial DSM (Nutricional Products), formulado con una enzima fitasa derivada de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae*. RONOZYME™P (CT) 5,000, es capaz de degradar fitatos e incrementar la disponibilidad de fósforo y otros componentes nutricionales presentes en alimentos de origen vegetal, lo que se traduce en una disminución en los costos de producción de los animales. Este producto fue homogenizado con los ingredientes secos en una razón de 0.5g (2500 U) por kilogramo de alimento como se muestra en la formulación (tabla 2).

RONOZYME™P (CT) 5,000 está diseñado con la tecnología especial de recubrimiento exclusiva de Novozymes (cubierta de protección de grasa vegetal sólida). Esto confiere a la preparación una serie de ventajas, como mayor estabilidad durante el almacenamiento y procesos térmicos, como peletizado en la elaboración del alimento, reducción de polvos y seguridad para los operarios por minimizar el riesgo de reacciones alérgicas cuando se maneja el producto. El rango de actividad de la enzima es de pH 4-7.

5.1.4.- Condiciones de manejo de los organismos.

El dispositivo experimental constó de 9 tinas de 400 L de capacidad, a una densidad de 80 organismos/tanque, los cuales fueron mantenidos a una salinidad de 36 partes por mil, temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por medio de un enfriador marca Acuabone y oxigenación a saturación (6.50 ± 0.50 mg/L) monitoreado por medio de un oxímetro de la marca HACH modelo hqd40. Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) fueron monitoreados dos veces al día (8:00 y 20:00h). El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La calidad del agua se mantuvo por medio de diferentes filtros; en el área externa se contó con un filtro de arena de lecho profundo, filtro UV y un cartucho de 50 μm . En el interior del área experimental (laboratorio húmedo) se contó con un sistema de recirculación con ozonificador, filtro de cartucho 20 μm y un espumador.

5.1.5.- Alimentación.

Los organismos fueron alimentados en 3 raciones diarias (8:00, 14:00 y 20:00 h) ración alimenticia que se calculó cada 10 días, tomando el peso promedio de 90 organismos, ajustando la ración al 3% de su biomasa y a la cantidad de alimento no consumido.

5.1.6.- Parámetros evaluados.

5.1.6.1.- Crecimiento y supervivencia.

- La supervivencia expresada en porcentaje (%) se obtuvo a partir de la diferencia entre los organismos (sembrados) al inicio y al final del experimento.

Tasa de supervivencia= (número final/número inicial) x 100.

- El crecimiento se evaluó comparando los promedios de pesos finales de cada tratamiento.

5.1.6.2.- Actividad enzimática.

La actividad enzimática de los organismos se evaluó mediante la obtención de extractos crudos de hepatopáncreas de estadios C y D0 (intermuda) de juveniles de *F. duorarum* provenientes de los tratamientos, los cuales fueron pesados para obtener el peso húmedo promedio y se almacenaron en microtubos Ependorff®, posteriormente fueron sumergidos en nitrógeno líquido (-180°C) y almacenados a -40°C hasta el momento de su análisis.

Los extractos de los hepatopáncreas se prepararon adicionando a cada microtubo 500 µl de agua destilada y se homogenizaron sobre hielo por 30 segundos con un rotor a velocidad de 4,000 rpm. Seguidamente se centrifugaron por 20 minutos a 14,000 rpm a 4°C. El sobrenadante (extracto crudo) se separó por decantación, el cual fue utilizado para medir la concentración de proteína soluble, actividad de tripsina y quimotripsina. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo manteniendo en todo momento las muestras a baja temperatura para evitar la desnaturalización de las enzimas, y los extractos crudos y diluidos se utilizaron inmediatamente para su análisis.

La concentración de proteína soluble se determinó utilizando el kit Micro Protein Determination (BIO-RAD 500-0006) de Sigma, basados en el método de Bradford (1976). Para la evaluación de tripsina, se utilizó el método propuesto por Geiger y Fritz (1988) utilizando BAPNA (benzoil-arginina-p-nitro-anilida) (Sigma B7632) 100 como sustrato en un amortiguador Tris 0.1 M, pH 8. La tasa de hidrólisis del sustrato se midió como el incremento en la absorbancia en un espectrofotómetro marca SPECTRONIC modelo 21D

a 405 nm durante dos minutos, obteniéndose la diferencia en absorbancia entre el primer minuto y el segundo utilizándose un coeficiente de extinción $\epsilon_{405}=1.021 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Geiger, 1988). Una unidad fue definida como la actividad correspondiente a 1 μM de p-nitro-anilida liberado en un minuto. La actividad de quimotripsina fue medida por el mismo método, utilizando SAPPNA (succinil-alanina-2-prolina-fenil-p-nitro-anilida) como sustrato de la reacción (Geiger, 1988).

5.1.7.- Análisis estadísticos.

La prueba estadística utilizada para analizar los resultados de supervivencia y crecimiento fue una ANDEVA de una vía. En lo que respecta a la actividad enzimática se aplicó el ANDEVA bifactorial de 2 X 3 (2 para el factor estadio de muda y 3 para el factor dieta) (Zar, 1999). En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una alfa 0.05. El análisis estadístico se realizó con el paquete Statistical Analysis Software Program of SAS 2006.

5.2.- Experimento 2. Efecto en la digestibilidad aparente de fósforo por dos métodos de inclusión de la fitasa en dietas con proteína vegetal para juveniles de *Farfantepenaeus duorarum*.

5.2.1.- Diseño experimental.

El diseño fue completamente aleatorizado con 3 tratamientos y 3 réplicas/tratamiento, donde se usaron juveniles ($11.46 \pm 2.39\text{g}$) de *Farfantepenaeus duorarum* obtenidos de estanques de cultivo exteriores de la UMDI, Sisal, Yucatán, México. Los cuales fueron mantenidos durante 60 días en un sistema de recirculación, en condiciones controladas de cultivo, (tanques de 400 L, a una densidad de 7 camarones/tanque) y alimentados con tres tratamientos: dieta vegetal con fitasa Ronozyme P5000 CT (DVFR), dieta vegetal con fitasa FTEII (DVFE), las cuales fueron comparadas

contra una dieta control elaborada con fuentes de proteína vegetal sin inclusión de fitasa (DC).

5.2.2.- Composición de las dietas.

En la tabla 3, se presenta la formulación de las dietas empleadas durante este segundo experimento: dieta vegetal con fitasa Ronozyme P5000 CT (DVFR), dieta vegetal con fitasa FTEII (DVFE), las cuales fueron comparadas contra una dieta control elaborada con fuentes de proteína vegetal sin inclusión de fitasa (DC).

Tabla 3. Composición de dietas experimentales con 40% de proteína (Experimento 2).

Materias Primas G/100g	Dieta control (DC)	Dieta Vegetal Ronozyme (DVFR)	Dieta Vegetal FTEII (DVFE)
Ensilado de mero	5	5	5
Conc. Proteico de soya (POFINE) ¹	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 bacalao ³	4	4	4
Lecitina de soya	1	1	1
Colesterol	0,5	0,5	0,5
Premix vitamínico y mineral ²	1,5	1,5	1,5
CMC	1	1	1
Zeolita ⁴	1,5	1,5	1,5
Ronozyme	-	0,05	-
Relleno	-	0,15	-
Total	100	100	100

¹Profine E, Central Soya Inc., 70.40% de proteína. ²Rovimix® Roche. ³Aceite de hígado de bacalao CEDROSA. ⁴zeolita 506 tierra de diatomeas lavadas con ácido, Celite Corporation. ⁵DSM Ronozyme P5000 CT (5000 U/g), FTEII (543 U/mL) 1600 U/kg de harina de soya y/o canola.

5.2.3.- Método de elaboración de las dietas experimentales.

Las dietas experimentales fueron hechas en el Laboratorio de Nutrición de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal, UNAM), siguiendo el protocolo de elaboración de una dieta artificial para camarón, que consistió en una molienda y tamizado de materias primas que fueron llevadas al mismo tamaño de partícula (250 micras) para poder ser homogenizadas en la mezcladora y después añadirle los aceites y el aglutinante, permitiendo que se mezclaran hasta formar la pasta que fue peletizada para poder secarse a 60°C durante 12 horas.

Las harinas (canola, soya) de la DVFE fueron pretratadas con una enzima fitasa FTEII, la cual es una forma recombinante producida por *Pichia pastoris* (actividad de 543 U/mL, con actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 9, y actividad máxima en un intervalo de temperatura de 25°C a 80°C), producida en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Viader *et al.*, 2010).

Así mismo, siguiendo el protocolo descrito por Nwanna *et al.*, (2007), ambas harinas (100 g de soya y 245 g de canola) se incubaron durante 15.5 horas a 40°C en una relación 1:1.5 (harina: agua), con la inclusión de 615 µL (160 U) y 1.5 mL (392 U) de fitasa (FTEII) en la harina de soya y harina de canola respectivamente, equivalentes a 1.6 U/g de harina vegetal tratada. Para posteriormente secarlas por 12.5 horas 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 también fue peletizada, como en el caso de la DC y DVFR.

Por otro lado, la fitasa granular Ronozyme P5000 CT fue incluida en la dieta (DVFR) junto con los ingredientes secos. En la cual se incluyó 0.5g de fitasa (2500 U) por kilogramo de alimento. La fitasa granular RonozymeTMP5000 CT, es una enzima fitasa derivada de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae*. El rango de actividad de la enzima es de pH 4-7.

5.2.4.- Condiciones de manejo de los organismos.

Se usaron 9 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 400 L con sistema de recirculación cerrado con 7 camarones/tanque los cuales fueron mantenidos a una salinidad de 36 partes por mil, temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por medio de un enfriador marca Acuabone y oxigenación a saturación (6.50 ± 0.50 mg/L) monitoreado por medio de un oxímetro de la marca HACH modelo hqd40. Los parámetros fisicoquímicos se revisaron dos veces al día (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto).

La calidad del agua se mantuvo por medio de diferentes filtros; en el área externa se contó con un filtro de arena de lecho profundo, filtro UV y un cartucho de 50 μm . En el interior del área experimental (laboratorio húmedo) se contó con un sistema de recirculación con ozonificador, filtro de cartucho 20 μm y un espumador. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

5.2.5.- Alimentación.

Los camarones tuvieron una aclimatación al lugar y a las dietas experimentales de 10 días antes de iniciar el experimento de digestibilidad. Posteriormente, los animales fueron alimentados 6 veces al día con las dietas experimentales y la colecta de las heces se realizaba después de cada alimentación (en la última alimentación ya no se hacía colecta).

5.2.6.-Técnica de colección de heces.

Los horarios de alimentación previos a cada colecta fueron los siguientes: 08:00, 09:00, 10:00. 11:00 y 12:00 h. Una hora después de alimentar, las heces eran sifoneadas con ayuda de un popote y vertidas en un papel filtro colocado en un embudo, después de

colectar, el alimento no consumido era retirado del tanque y nuevamente se alimentaba. Al terminar cada colecta, los filtros de cada tanque eran refrigerados a 4°C hasta la siguiente colecta. En la colecta final del día, las heces eran lavadas con agua destilada y luego eran guardadas en una estufa de secado a 60°C. A las 18:00 h se daba una última alimentación a los camarones. Al final se colectaron alrededor de 2 g/tanque de heces (peso seco).

5.2.7.- Parámetros a evaluar.

5.2.7.1.- Determinación de la Digestibilidad Aparente.

Para el análisis de la digestibilidad de materia seca, proteína y fósforo se utilizó la técnica de AIA (Ceniza Insoluble en Ácido) usando como marcador la zeolita (Cuzon, 1998), en base a la fórmula descrita en Cousin *et al.*, (1996).

Las formulas empleadas para determinar la digestibilidad aparente de la proteína (DAP), de la materia seca (DAMS), de la energía (DAE) y del fósforo (DAF) son las siguientes:

%DAP = 100 x (1 - (% zeolita en el alimento/% zeolita en heces) (% proteína en heces/% proteína en el alimento)).

%DAMS = 100 x (1- (% zeolita en la dieta/ % zeolita en las heces)).

%DAF= 100 x (1 - (% zeolita en el alimento/% zeolita en heces) (% fósforo en heces/% fósforo en el alimento)).

El nivel de fósforo fue determinado por la técnica (anexo II) establecida por Taussky y Shorr (1952) y el método de la Asociación oficial de análisis químicos (AOAC, 1995).

La concentración de fósforo en las muestras fue calculada siguiendo la fórmula establecida por la AOAC (1995).

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

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 en mg.

W = peso de la cantidad de muestra (mg).

5.2.7.2.- Composición química proximal y aminoacídica de dietas y organismos de *F. duorarum*.

El análisis químico proximal de las dietas se determinó en el Laboratorio de Análisis Químicos para Alimentos del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, según el protocolo de la AOAC (1990). La determinación de la composición aminoacídica de las dietas y de la proteína del músculo abdominal de *F. duorarum* y de las dietas, se realizó mediante el protocolo (anexo III) de la AOAC (2000).

El cómputo químico de los aminoácidos, se determinó mediante la fórmula:

$$CQ = (D \text{ aa} / R \text{ aa}) * 100$$

Donde:

CQ= cómputo químico.

D aa = aminoácido dieta.

R aa = aminoácido referencia (camarón).

5.2.8.- Análisis estadísticos.

A los coeficientes de digestibilidad (transformados en Arcoseno radial) se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para determinar la posible existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Se realizó una regresión lineal a los resultados obtenidos de la actividad de la tripsina en intermunda y la digestibilidad aparente de la proteína, para determinar el grado de correlación. En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una probabilidad de (alfa) 0.05. El análisis estadístico se realizó con el paquete Statistical Analysis Software Program of SAS 2006.

VI. RESULTADOS

6.1.- Experimento 1. Evaluación de dos tipos de inclusión de fitasa (pretratamiento con PhyC-R y la inclusión directa de Ronozyme P5000 CT) en dietas vegetales (soya y canola) de juveniles de camarón.

6.1.1.- Crecimiento y supervivencia.

En relación con el crecimiento, el ANDEVA para los pesos finales indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), obteniendo los mejores valores con la DVFP (2.15 ± 0.28), que superó a la DVFR (1.93 ± 0.28) y la DC (1.88 ± 0.18) que presentó los valores más bajos, como se muestran en las Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 4. Datos de crecimiento de *F. duorarum*. (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP). Promedios \pm error estándar).

	DC	DVFR	DVFP
Peso Inicial (g)	0.65 ± 0.04^a	0.64 ± 0.03^a	0.68 ± 0.04^a
Peso Final (g)	1.88 ± 0.18^a	1.93 ± 0.28^a	2.15 ± 0.28^b

*Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). *Peso final promedio determinado en 149, 148 y 163 replicas por tratamiento (DC, DVFR y DVFP), respectivamente.

Tabla 5. ANDEVA del bioensayo de crecimiento en *F. duorarum*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.54	2	4.274	9.71	8.0E-05	3.02
Dentro de los grupos	140.41	319	0.440			
Total	148.96	321				

En relación a la supervivencia el ANDEVA no produjo diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$) (tabla6).

Tabla 6. Datos de supervivencia. (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP). Promedios \pm error estándar).

	DC	DVFR	DVFP
Supervivencia %	87.5 \pm 4.5 ^a	87.5 \pm 7.8 ^a	87.5 \pm 3.3 ^a

*Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

6.1.2.- Proteína soluble, actividad específica de la tripsina y la quimotripsina.

La tabla 7 muestra los valores promedios obtenidos para la concentración de proteína soluble en los tratamientos (DC, DVFR y DVFP), los valores se muestran en mg/g de tejido de glándula digestiva (mg/g GD). Los cuales no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en los factores dieta, muda y muda-dieta, al ser analizados estadísticamente.

Tabla 7. Promedios de concentración de la proteína soluble \pm error estándar. (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP).

Proteína soluble	C	D0
DC	45.88 \pm 13.06 ^a	42.61 \pm 15.02 ^a
DVFR	62.74 \pm 15.62 ^a	46.36 \pm 8.06 ^a
DVFP	45.47 \pm 6.20 ^a	43.89 \pm 14.51 ^a

*Los valores se presentan en mg/g de tejido de glándula digestiva (mg/g GD). *Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$). *Promedios determinados en seis replicas por tratamiento.

En lo que respecta a la actividad específica de la tripsina proveniente del hepatopáncreas de los juveniles de *F. duorarum*, el ANDEVA bifactorial indicó que no

hubo un efecto significativo por acción de la dieta, ni interacción muda-dieta ($p>0.05$). El estadio de muda, como efecto principal, si se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos. La actividad significativamente más elevada se presentó en el estadio D_0 , para todas las dietas, mientras que en intermuda los valores de actividad de esta enzimas fueron menores ($p<0.05$). Los valores promedios obtenidos de actividad de tripsina se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Promedios de actividad de la tripsina \pm error estándar. (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP).

Tripsina	C	D₀
DC	62.14 \pm 14.90 ^a	113.82 \pm 40.34 ^b
DVFR	78.96 \pm 13.73 ^a	92.90 \pm 43.92 ^b
DVFP	72.2 \pm 17.00 ^a	100.01 \pm 42.80 ^b

*Los valores se presentan en U/g de tejido de glándula digestiva (U/g GD). *Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$). *Promedios determinados en seis replicas por tratamiento.

De igual manera, el ANDEVA bifactorial para la actividad de la quimotripsina hepatopancreática indicó diferencias significativas ($p<0.05$) entre los estadios de muda para todos los tratamientos. Los valores provenientes de las actividades en estadios D_0 fueron significativamente mayores que los observados en la intermuda (C). En lo que respecta a los factores dieta e interacción muda-dieta, no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$). En la tabla 9 se presentan los valores promedios obtenidos para la actividad de quimotripsina en estadios C y D_0 .

Tabla 9. Promedios de actividad de la quimotripsina \pm error estándar. (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP).

Quimotripsina	C	D0
DC	1115.71 \pm 793.22 ^a	586.42 \pm 258.77 ^b
DVFR	1042.65 \pm 320.68 ^a	661.45 \pm 243.57 ^b
DVFP	986.141 \pm 412.59 ^a	502.53 \pm 288.76 ^b

*Los valores se presentan en U/g de tejido de glándula digestiva (U/g GD). *Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). *Promedios determinados en seis replicas por tratamiento.

6.2.- Experimento 2. Efecto en la digestibilidad aparente de fósforo por dos métodos de inclusión de la fitasa en dietas con proteína vegetal para juveniles de *Farfantepenaeus duorarum*.

6.2.1.- Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA).

El ANDEVA de una vía indicó que los valores del Coeficientes de Digestibilidad Aparente de proteína y fósforo de los tres tratamientos (DC, DVFR y DVFE) fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En lo que respecta al CDA materia seca el ANDEVA indicó que la DVFR presentó los mayores valores en comparación con la DC y DVFE presentando diferencias significativas ($p < 0.05$), estos resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Coeficientes de Digestibilidad Aparente (CDA). (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP).

Dietas	DC	DVFR	DVFE
CDA _{Materia}	76.01 \pm 3.6 ^a	87.41 \pm 1.5 ^b	79.69 \pm 1.5 ^a
CDA _{Proteína}	93.17 \pm 1.03 ^a	96.06 \pm 0.46 ^b	95.02 \pm 0.37 ^b
CDA _{Fósforo}	50.84 \pm 8.45 ^a	86.30 \pm 2.42 ^b	89.53 \pm 3.45 ^b

*Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). * Los valores están expresados en %. *Promedios determinados en tres replicas por tratamiento.

6.2.2.- Composición química proximal (CQP) y aminoacídica (CQaa) de las dietas.

Los resultados del análisis químico proximal de las dietas se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición proximal de las dietas (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP)).

Dietas	M	H	PC	EE	C	FC	ELN
DC	94.44	5.56	36.84	6.61	7.84	2.42	40.73
DVFR	95.76	4.23	37.54	6.46	6.97	2.38	42.42
DVFP	94.04	5.96	37.01	6.29	7.80	2.56	40.38

*Los resultados se expresan en base húmeda. Materia seca (M), Humedad (H), Proteína cruda (PC), Extracto etéreo (EE), Cenizas (C), Fibra cruda (FC), Extracto libre de Nitrógeno (ELN).

La determinación de la composición aminoacídica de las dietas y de organismos de *F. duorarum* se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de aminoácidos (g aa/ 100g de proteína). Promedios \pm error estándar.

Aminoácidos	Dieta vegetal control	Dieta vegetal Ronozyme	Dieta vegetal FTEII	Músculo abdominal <i>F. duorarum</i>
Lys	6.10 \pm 0.09	5.87 \pm 0.25	6.35 \pm 0.11	4.9 \pm 0.20
Arg	6.10 \pm 0.03	5.69 \pm 0.15	5.66 \pm 0.33	3.6 \pm 0.08
His	2.89 \pm 0.05	2.70 \pm 0.00	2.75 \pm 0.08	1.3 \pm 0.06
Leu	8.12 \pm 0.05	8.08 \pm 0.03	8.09 \pm 0.25	4.5 \pm 0.15
Ile	4.24 \pm 0.06	4.11 \pm 0.04	4.14 \pm 0.11	2.5 \pm 0.13
Val	4.27 \pm 0.03	4.15 \pm 0.04	4.24 \pm 0.12	2.8 \pm 0.17
Thr	4.64 \pm 0.07	4.53 \pm 0.05	4.59 \pm 0.03	4.0 \pm 0.04

Met	0.79±0.04	0.75±0.01	0.75±0.02	1.4±0.05
Phe	6.02±0.19	5.76±0.07	7.04±0.29	7.7±1.02
Trp	6.48±0.14	6.10±0.16	6.66±0.92	-----
Tyr	0.74±0.04	0.66±0.01	-----	2.0±0.09
Ala	5.70±0.05	5.59±0.17	5.83±0.09	3.8±0.14

*Resultado de dos determinaciones. *Cys: condiciones temperatura y concentración, imposibilitan su determinación.*----Niveles bajos para su determinación.* Aminoácidos limitantes.

El cómputo químico realizado entre la composición aminoacídica de las dietas y el camarón, permite determinar que la tirosina (Tyr) y metionina (Met) son los aminoácidos limitantes para los juveniles de *F. duorarum* como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Cómputo químico (CQ) de aminoácidos (Relación porcentual).

Aminoácidos	Dieta vegetal control	Dieta vegetal Ronozyme	Dieta vegetal FTEII
Lys	100	100	100
Arg	100	100	100
His	100	100	100
Leu	100	100	100
Ile	100	100	100
Val	100	100	100
Thr	100	100	100
Met	56	53	53
Phe	77.7	74.4	90.9
Trp	100	100	100
Tyr	36	32	----
Ala	100	100	100

----Niveles bajos para su determinación. Aminoácidos limitantes.

6.2.3.- Integración de los resultados de digestibilidad aparente y actividad enzimática.

Con la finalidad de integrar los resultados de la digestibilidad aparente y la actividad endógena de la tripsina hepatopancreática en intermuda, se realizó una prueba de correlación (Figura 1).

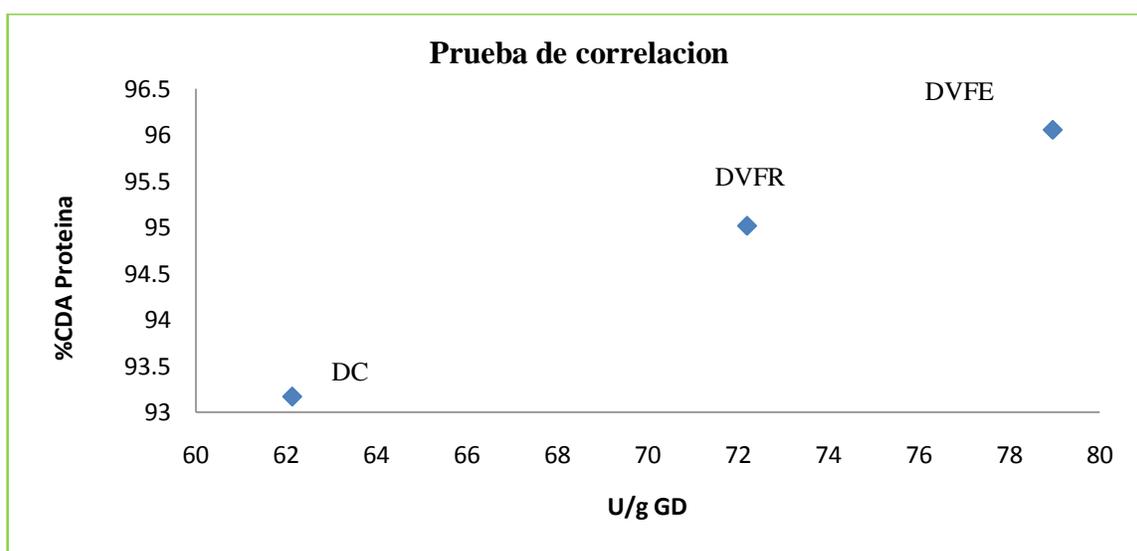


Figura 1. Promedios de actividad de la tripsina vs CDA Proteína (Dieta control (DC); dieta con Ronozyme (DVFR) y dieta con fitasa bacteriana (DVFP)). Unidades por gramo de tejido de glándula digestiva (U/g GD).

Se encontró una correlación positiva y significativa entre la actividad de la tripsina en intermuda (C) y el CDAP ($r=0.99$). La menor actividad de tripsina se observó en el tratamiento control, que coincide con el menor coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína (CDAP) como se muestra en la Figura 1.

VII. DISCUSIÓN

La presente investigación ha demostrado que la inclusión de la fitasa en sus dos presentaciones (Ronozyme y FTEII/ PhyC-R) mejoró la calidad de las dietas en las que se mezcló la pasta de soya y la pasta de canola para la alimentación de los juveniles del camarón rosado del Golfo de México. El aumento de la digestibilidad aparente de fósforo es la evidencia de que desaparece el ácido fítico como factor antinutricional. Al desaparecer dicho factor se mejoró significativamente la digestibilidad aparente de la proteína, como lo demuestra la correlación significativa entre este indicador y la actividad de la tripsina hepatopancreática en el estadio C o intermuda. Ello produjo una mejoría significativa de las tasas de crecimiento de los juveniles de *F. duorarum*, aun cuando en general se observaron bajos valores de este indicador, pero más bien ligados a la deficiencia de metionina en dichas dietas, como lo demuestran los resultados del cómputo químico.

Como se mencionó en los antecedentes, los juveniles del camarón rosado son capaces de digerir proteína de origen vegetal, tal como lo demostró Aragón *et al.*, (2011). Sin embargo, y aunque no se evaluó para nuestra especie en estudio, se ha postulado que en general los camarones, no son capaces de hidrolizar compuestos tales como el ácido fítico (Martínez *et al.*, 2002), que se presenta en concentraciones importantes en las pastas de origen vegetal. Por ello la inclusión de la fitasa exógena, en cualquier presentación probada, en el presente estudio mejoró la digestibilidad aparente de fósforo y de proteína de los juveniles alimentados con dietas ricas en proteína vegetal.

Lim y Akiyama (1993); Carrillo *et al.*, (2007); Molina y Lucas (2007), encontraron que la presencia de altas cantidades ácido fítico en las fuentes de proteína vegetal, es un factor limitante para lograr la sustitución total de proteína animal en alimentos balanceados para los camarones peneidos. Por ello los autores sugieren la inclusión de una fitasa exógena ya sea durante la digestión o durante el procesamiento del alimento, para que se

realice la hidrólisis del ácido fítico (Harter-Denis, 1999; Martínez *et al.*, 2002). Por tal motivo, en el presente estudio se contempló el uso de dos métodos de inclusión (directo/pretratamiento de harina) de fitasas en los alimentos usados para los juveniles de *F. duorarum*, que además permitió un aumento en la biodisponibilidad y digestibilidad de nutrientes quelados por el ácido fítico, como lo demuestran los valores de digestibilidad aparente de fósforo.

En general los CDA presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre el grupo de las dietas tratadas con fitasa (DVFR y DVFE), y la dieta control sin fitasa. Presentando un CDA_{Proteína} de 95, 96 y 93% respectivamente; en cuanto al CDA_{Fósforo}, la DVFE presentó una tendencia hacia el valor más alto con un 89% seguido por DVFR con 86% y DC con un 50%, siendo este el más bajo. Este mismo efecto por la inclusión fitasa en dietas, son reportados por Ricque *et al.*, (2004), al determinar un incremento en los coeficientes de digestibilidad de materia seca, proteína y de fosforo en *Litopenaeus vannamei*, cuando se incluyen 1000 U de fitasa Allzyme en dietas con 40% proteína de origen vegetal, teniendo un aumento del 180% de digestibilidad aparente de fosforo, y un incremento del 7 al 8% en la digestibilidad aparente de materia seca y proteína, en relación a los coeficientes de digestibilidad obtenidos con la dieta sin inclusión de fitasa.

Para el caso de peces, se reporto por Phromkunthong W. Y Gabaudan J., (2006) en tilapia roja (*Oreochromis sp.*) un aumento en el CDA Fosforo (45, 51, 61, 63 y 61%) en relación al nivel de inclusión de fitasa (0, 500, 1000, 2000 y 4000 FTU/kg) en dietas vegetales a base de soya y arroz. Así mismo, Denstadli *et al.*, (2007) obtuvieron un incremento del 66 al 81% CDA Fosforo, cuando los organismos de Salmon (*Salmo salar*) fueron alimentados con dietas a base de soya tratada, con 2900 U/kg de dieta con fitasa Quantum® 5000 L.

En relación a la actividad enzimática, estudios realizados con peneidos, Fox *et al.*, (1997), determinaron en hepatopáncreas de *L. vannamei*, que existe un incremento lineal de la actividad de tripsina cuando se incrementan las unidades de fitasa. No obstante, Fox

et al., (2004) no establecen una correlación positiva entre la actividad tripsina y la tasa de crecimiento, cuando juveniles de *L. vannamei* fueron alimentados con dietas basales con 31% de soya, y la adición de diferentes niveles (0,1000 y 2000 FTU). Por otro lado, Biswas *et al.*, (2007) no reportaron un incremento en el crecimiento cuando organismos de *P. monodon* fueron alimentados con dietas a base de soya y 500 FTU Natuphos[®]. Lo que pudiera atribuirse: a bajos niveles de fitasa utilizado por kilogramo de alimento, que el fósforo liberado no fue el suficiente para producir un efecto en el crecimiento, que el sistema digestivo ligeramente básico de *L. vannamei* y *P. monodon*, no proporcionó un pH óptimo para la actividad de la fitasa, y que cuando se combina con un paso rápido del alimento por el intestino, podría no haber permitido el tiempo necesario para la hidrólisis del fitato.

Los resultados del presente trabajo no indican un efecto positivo en el aumento de las concentraciones de proteína soluble y la actividad de la quimotripsina en los juveniles de *F. duorarum* alimentados con dietas tratadas con fitasa. Sin embargo, con respecto a la actividad de la tripsina se observó que al disminuir el ácido fitico se mejoró significativamente CDA de la proteína por la acción de la tripsina en intermuda, lo que permite suponer que la disminución o eliminación del AF repercute en la liberación de iones Ca, necesarios para la conversión del tripsinógeno a enzima activa, como lo reportado por Barros *et al.*, (2002); Divakaran y Ostrowski., (1998), al determinar en *Penaeus vannamei* y *Oncorhynchus mykiss* efecto negativo de la presencia de AF en la actividad enzimática de la tripsina *in vitro* y la disminución de la biodisponibilidad de la proteína *in vivo*.

Lo cual, pudiera indicar que la fitasa puede ejercer un efecto indirecto pero positivo en la hidrólisis de las proteínas. Siendo, esto respaldado por Ceballos (2009), al reportar una ganancia de peso cuando postlarvas de *F. duorarum*, fueron alimentadas con dietas a base de soya, canola, y una inclusión de 2500 FTU/kg de dieta con fitasa Ronozyme[®]. No obstante, los resultados del presente bioensayo permiten indicar que la dieta formulada con el pretratamiento a las harinas de soya y canola con PhyC-R corresponde al mejor método

de inclusión de fitasa, al presentar diferencias significativas ($p < 0.05$) en el peso promedio final (2.15 ± 0.28 g), en comparación con al tratamiento de inclusión directa de fitasa Ronozyme (1.93 ± 0.28 g) y la dieta control vegetal sin fitasa (1.88 ± 0.18 g).

Según Storebakken *et al.*, (1998) el tratamiento de fitasa en concentrado de soya (mojado-incubación), reduce el ácido fítico contenido de la dieta de 8 g kg^{-1} a menos de $0,5 \text{ g kg}^{-1}$ y, en consecuencia lleva un incremento significativo en la digestibilidad de P, Ca, Mg y Zn en dieta con soya. Permitiendo suponer que los efectos combinados de incubación e inclusión de fitasa neutralizan los efectos negativos del fitato sobre la digestibilidad de los nutrientes

La supervivencia promedio fue de 87%, la cual es inferior a lo reportado por Samocha *et al.*, (1997) donde reportó el 95% supervivencia cuando los organismos de *L. vannamei* fueron alimentados con un extruido de soya y subproductos de aves. Sin embargo, Chhorn y Warren (1989), reportaron que al sustituir 0, 20, 40, 60, 80 y 100% de proteína animal (anchoveta) por proteína vegetal (soya) las tasas de supervivencia obtenidas entre los tratamientos en organismos de *L. vannamei* no presentaron diferencias significativas, manteniéndose en rango entre 86.7 y 98.3. Lo que permite suponer, que los juveniles de *F. duorarum* alimentados con dietas a base de proteína vegetal presentaron buenas condiciones de salud durante el período experimental. Respaldando que un pretratamiento con fitasa a las fuentes vegetales, reduce los componentes de fitato en las dietas y/o que se unan con el fósforo procedentes de otros ingredientes, permitiendo de esta manera una mayor biodisponibilidad de los minerales.

No obstante, debido a que la funcionalidad de la fitasa Ronozyme está basada en la ingesta del camarón, es necesario evaluar el nivel de lixiviación de la fitasa Ronozyme en el medio, al no presentar un efecto positivo en la alimentación de juveniles. Así mismo, es importante determinar la viabilidad del método de pretratar a las harinas de soya y canola con fitasa experimental en la formulación de alimentos para camarones de *F. duorarum*. Sin dejar de considerar, que se utilizó 4.5 veces menos unidades de fitasa por gramo de

harina durante el pretratamiento de pastas (soya y canola) con fitasas experimentales (PhyC-R/FTEII), en comparación de dietas con inclusión de Ronozyme, la cual represento el uso de 7.2 U/g de harina.

Es importante que la formulación de un alimento cubra los requerimientos aminoacídicos de los organismos para un correcto desarrollo, siendo esto expresado en una alta tasa de crecimiento. Por lo que pudiéramos indicar una baja tasa de crecimiento generalizado en los tratamientos (0.17 g/semana) en juveniles de *F. duorarum* obtenidos en este bioensayo, en contraste con los reportados por Álvarez *et al.* (1987) de una ganancia 0.49 g semana⁻¹ en juveniles de esta especie en el medio natural, mientras que Pastor (2001) logró una ganancia promedio 0.46 g semana⁻¹ desde Pl₃₅ hasta los 180 días que duró el experimento, pero con muy baja sobrevivencia, lo cual hace suponer que hubo canibalismo.

Las bajas tasas de crecimiento obtenidas en este experimento, pudieran ser debido a deficiencia en metionina (Met) el cual fue identificado como un aminoácido limitante en las dietas evaluadas en el presente trabajo. Siendo esto reforzado por Foster y Dominy (2006) los cuales, determinaron que juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas deficientes de metionina presentan una menor tasa de crecimiento semanal (0.93 g/semana) que aquellos alimentados con suplementos de metionina (1.00 g/semana), el cual representa una fuente de azufre e interviene en el metabolismo de proteínas y lipidos.

Millamena *et al.*, (2000) reportaron que el requerimiento de metionina en *Penaeus monodon* es ligeramente menor que el nivel de metionina en la proteína del tejido del camarón. Para el caso de tirosina como siguiente aminoácido limitante Webster y Chhom (2002), mencionan que la deficiencia de este aa, no repercute de manera significativa en la tasa de crecimiento de los organismos por ser un aminoácido no esencial, que puede ser sintetizado a partir de Phe (Fenilalanina).

VIII. CONCLUSIONES

El pretratamiento de las harinas (soya y canola) con fitasa PhyC-R favoreció el crecimiento en camarones juveniles de *F. duorarum*.

La actividad enzimática de tripsina y quimotripsina del hepatopáncreas de juveniles de camarón *F. duorarum* no fue afectada por las dieta en la que se combinó la harina de soya y canola pretratadas con fitasa PhyC-R, aunque se encontró una correlación significativa entre la actividad de la tripsina en intermuda y la digestibilidad aparente de la proteína.

El pretratamiento con PhyC-R a harinas vegetales (soya y canola) no afectó la concentración de proteína soluble presente en el hepatopáncreas del camarón *F. duorarum*.

El método de pretratamiento con FTEII y la inclusión de fitasa Ronozyme en alimentos a base de harinas vegetales (soya y canola) no repercutió de manera negativa en la digestibilidad aparente de a materia seca (CDA_{MS}).

La inclusión de fitasa por el método pretratamiento con FTE y/ o la inclusión directa de Ronozyme en dietas a base de harinas de soya y canola, permitirá una mayor digestibilidad de los nutrientes de la dieta y facilitó la biodisponibilidad de fósforo y proteínas que forman complejos con el fitato, representando así una dieta viable para el cultivo de juveniles de *F. duorarum*.

F. duorarum en etapa juvenil tiene la capacidad para aprovechar de una manera eficiente los nutrientes de las harinas vegetales utilizadas en este estudio.

Se recomienda evaluar el nivel de fósforo fítico de soya y canola para determinar el grado de hidrólisis producido por la inclusión de fitasas.

Es necesario realizar pruebas sobre inclusión de metionina para balancear la composición aminoacídica de las dietas en relación a la composición de aa del cuerpo del camarón, determinando con ello las tasas de crecimiento semanal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aragón H., Chiappa X., Soto L, Cuzon G., Maldonado C., Cárdenas R., Y Gaxiola G. (2011). Seasonal variability in trypsin and α -amylase activities caused by the molting cycle and feeding habits of juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). Journal of Crustacean Biology.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Álvarez, F., A. Gracia, L. Soto 1987. Crecimiento y Mortalidad de las Fases Estuarinas del (2):207-220. Camarón Rosado *Penaeus (Farfantepenaeus) duorarum* Burkenroad, 1939 en la Laguna de Términos, Campeche, México. An. Inst. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México 14
- Barros, A., Alarcón, F., Moyano, F.Y Martínez, T. 2002. Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis in vitro de la proteína en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18: 95-98.
- Balsine, M., Fraga, I. Y Galindo, J. 2003. Inclusión de ensilado de pescado como alternativa en la elaboración de alimento extruido para el camarón de cultivo (*Litopenaeus schmitti*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 200. 303-309.
- Bertullo, E. 1989. Desarrollo del ensilado de pescado en América Latina 2da. Consulta de Expertos sobre Tec. Pesq. en América Latina FII819/RLAC/2. pp. 24-45.
- Biswas, P., Pal, A.K., Sahu, N.P., Reddy, A.K., Prusty, A.K., Misra, S. (2007). Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. Aquaculture 265: 253–260.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

- Buchanan, J. Sarac, H. Z., Poppi, D., Cowan, R.T. 1997. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. *Aquaculture* 151: 29-35.
- Cabrera, M., Puerto, M., Ramos, A., Saadoun, A. Y Marchesoni, A. 2002. Evaluación de la biodisponibilidad del fósforo orgánico e inorgánico a través de la solubilidad in vitro y utilización in vivo. *Agrociencia*.6:69-78.
- Carrillo, O. 2007. Manual de ingredientes protéicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editores: Tsai García Galano, Humberto Villarreal-Colmenares y Jorge L. Fenucci. Editorial Universitaria de Mar del Plata. Argentina.
- Cavazos, D. y Ricque, M. 2008. Manual de Metodologías de Digestibilidad in vivo e in vitro para Ingredientes y Dietas para Camarón. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty., N.L., México. ISBN:978-607-433-020-5. pp. 35.48
- Ceballos, R.L. (2009). Evaluación del efecto de la nutrición del camarón rosado del Golfo de México *Farfantepenaeus duorarum* en proceso de domesticación en la UNAM, Yucatán. Tesis para obtener el grado de ingeniero en pesquería con opción: Acuicultura. Instituto Tecnológico de Lerma. Lerma, Campeche México, 74p.
- Colvin, L.B. y Brand, C.W. 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life-cycle stages in controlled environment systems. *Journal World Mariculture Society* 8:821
- Copes J., Pellicer K., Hoyo G. Y García N. 2006. Producción de ensilado de pescado en baja escala para uso de artesanales. Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Marín, L., Guajardo, C., Nieto, M. Y Salinas, A. 2002. Historia y estatus actual de la digestibilidad y de algunas características fisicoquímicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

- Cruz, L., Ricque, D., Tapia-, M., McCallum, I. M. Y Hickling, D. 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196:87-104.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 8: 87-94.
- Diario Oficial. 2006. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
- Divakaran, S. y Ostrowski, A. 1998. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Caryphaena hippurus*. *J.W.A.S.* 21, 35-40.
- Dominy, W.G. y Lim, Ch. 1991. Evaluation of soybean meal extruded with squid viscera as a source of protein in shrimp feeds. En: Akiyama, D.M, Tan, R.K.H (Eds.) *Proceedings of the Aquaculture feed processing and nutrition workshop*. Tailandia e Indonesia, Septiembre 19-25, pp. 116-120.
- FAO. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Project reports No.4 pp. 592.
- FAO. 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- FAO, 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- Faucon M. 1997. Contribution to the low pollution feed for juveniles of *L. stylirostris*. Report Ifremer COP:22
- Febles C., 1998. Tesis Doctoral. Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en canarias. Universidad de la Laguna, España.
- Fennema, O. 2000. Química de los Alimentos. 2ª Ed. Editorial Acribia, España. pp. 1126-1127.

- Fennuci, J., A., Lawrence, A.I, Zein Eldin, Z.P. 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp *Penaeus stylirostris*. J. World Mariculture, 13: 134-145.
- Foster, I.P., Dominy, W., Tacon, A. (2002). The use of concentrates and other soy products in shrimp feeds. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana Roo, México: 527-540.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L., Siccardi, A.J., Davis, D.A., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, E., Samocha, T.M. (2006). Phytase supplementation in aquaculture diets improves fish, shrimp growth performance. Global Aquaculture Advocate: 64-66.
- Fu S., Sun J., Qian L. y Li Z. 2007. Bacillus Phytases: Present Scenario and Future Perspectives. Appl. Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-008-8158-7.
- Galicia, A. 2003. Utilización de hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como aditivo en alimentos para juveniles de camarón *Litopenaeus* . Tesis en opción al grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, pp 131.
- Galindo, J.2007. Manual de ingredientes protéicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editores: Tsai García Galano, Humberto Villarreal-Colmenares y Jorge L. Fenucci. Editorial Universitaria de Mar del Plata. Argentina
- García, T., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., Soto L., López N. Y Rosas C., 1998. Influencia de las proteínas dietéticas sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de las postlarvas del Camarón Blanco (*Penaeus setiferus*) y del Camarón Rosado (*P. duorarum*) del Golfo de México. Revista AquaTIC, nº 2.
- Gaxiola, M. 1994. Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *P. duorarum* Tesis para obtener el título de doctor en ciencias (BIOLOGIA).Universidad Autónoma de México. D.F. México.
- Geiger, R. 1988. Chymotrypsin. In Methods of enzymatic analysis.Vol V. e d. Bergmeyer, J.And Grab, I.M. pp. 99-104.

- Göhl, B. (1982): Piensos Tropicales. Resúmenes Informativos sobre piensos y valores nutritivos. Colección FAO. 420.
- Gómez, C. 2005. Determinación y cuantificación de mioinositol y ácido fólico en alimento y contenido intestinal de salmón mediante HPLC acoplado a detector de índice de refracción. U.A.C. Facultad de Ciencias. Valdivia, Chile.
- Gómez-Villalva. 2005. Transformación y mejora del valor nutritivo de la harina de guisante mediante la adición de enzima fitasa. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- González, D., Córdoba, J., Indorf, F. y Biutrago, E. 2007. Estudios preliminares en la formulación de dietas para camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*) utilizando ensilado de pescado. Revista Científica. XVIII. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 02:166-172.
- Gracia, A. 1995. Impacto de la pesca artesanal sobre la producción del camarón rosado *Penaeus. Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). Ciencias Marinas. 21: 343-359
- Greiner R. y Konietzny U. 2006. Phytase for food application. Food Technol. Biotechnol. 44 (2) 125-140.
- Guerrero, M., Rodríguez, L.Y Viader, J. 2007. Producción de una fitasa recombinante en *Pichia Pastoris*. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.10:413-418.
- Guerrero-Olazarán, M., Rodríguez-Blanco, L., Carreon-Treviño, J.G., Gallegos-López, J.A., Viader-Salvadó, J.M. 2010. Expression of *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 76(16): 5601-5608
- Hardy, R. 1999. Alternative protein sources. Feed Managements.50:25-28.
- Hardy, R. 2000. New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.

- Hardy, R. 2008. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of grains and oilseeds. Pp.6-12. Editores: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto, M., Lazo, J. y Viana, M. Avances En Nutrición Acuícola IX. Simposio Internacional De Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma De Nuevo León, Monterrey, México.
- Harter-Denis, J. 1999. En: Biotechnology in the feed industry. Proc. Alltech's 15th Annual Symposium. Ed. T.P. Lyons y K.A. Jacques. Nottingham University Press. pp: 511-522.
- Hernández, G., Godoy, S. y Chicco, C. 2006. Biodisponibilidad del fósforo de cereales en aves. Revista Científica, FCV-LUZ. 16:149-154.
- Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Beames, R.M., Prendergast, A.F., Mwachireya, S.A., Deacon, G. 1996. Nutritive value of rapeseed/canola protein products for salmonids. In Eastern Nutrition Conference, Halifax, Canada, May 15-17. pp. 187-196.
- Huang H., Luo H., Wang Y., Fu D., Shao, N., Wang G., Yang P., y Yao B. 2008. A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 80:417-426.
- Lawrence, L.A., Castille, I.F., Sturmer, N.I. y Akiyama, M.D. 1986. Nutritional response of marine shrimp to different levels of soybean meal in feeds. En: Akiyama, D.M., American Soybean Association, Singapore pp. 9.
- Lee, P.G. y S.P. Meyers. 1996. Chemoattraction and feeding stimulation in crustacea. *Aquacult. Nutr.* 2:157-164.
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., Brinch-Pedersen, H. 2007. Phytase: source, structure and application, p. 505-529. In J. Polaina and A. P. MacCabe (ed.), Industrial enzymes: structure, function and applications. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Lei X. y Stahl C. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Appl. Microbiol Biotechnol. 57:474-481.

- López-Téllez, N., Hernández, J., Ramírez H. Y Seca J. 2000. Crecimiento del camarón rosado *Farfantepenaeus duorarum* en estanques rústicos. INP. SAGARPA. México. Ciencia Pesquera No. 14.
- Martínez J., Arreguín F., Hernández S., García A. y Valenzuela W. 2003. Interannual variation of growth of the brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* and its relation to temperature. Fisheries Research 61:95–105.
- Martínez, B., Ibáñez M. Y Rincón, F. 2002. Acido fitico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición.52:219-232.
- Martínez-Córdova L., Martínez M. Y Cortés E., 2009. Camaronicultura mexicana y mundial. ¿Actividad sustentable o industria contaminante? Rev. Int. Contam. Ambient. 25 (3), pp. 181-196.
- Mattos J., Chauca L., Martín F., Carcelén F. y Arbaiza T. 2003. Uso del ensilado biológico de pescado en la alimentación de cuyes mejorados. Rev. Inv. Vet Perú; 14(2): 89-96.
- Méndez, M., Lizama, G., Gaxiola, G., Cuzon, G., Apodaca, J., Ortega, B.Y Arena, L. 2008. Análisis de las poblaciones bacterianas presentes en *Farfantepenaeus duorarum* silvestres y cultivados. XXVII Congreso Nacional 16 al 21 de Noviembre, Mérida, Yucatán, México.
- Mendoza R. (1993). Métodos para evaluar la digestibilidad proteica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. En: Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Cruz-Suárez E, Mendoza R, Ricque P (eds). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey. pp. 155-202.
- Mendoza, R., Montemayor, J., Verde, J., Aguilera, C. 1996. Quimioatracción en crustáceos: papel de moléculas homologas. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Mendoza, R. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 11-13 de Noviembre de 1996. Monterrey, Nuevo León, México, pp. 365-401.
- Mendoza, R., Aguilera, C. y Montemayor, J. 2000. Utilización de subproductos avícolas en las dietas para organismos acuáticos. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV*.

- Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. pp. 398-439.
- Miranda, O., Otero, M. y Cisneros M. 2001. Ensilaje de pescado a partir de subproducto de la captura del camarón. Características físico-químicas. Rev. prod. anim. Vol. 13:9.
- Molina, C. Y Pina, P. E. 1999. Estudio comparativo de sistemas de alimentación utilizados en el engorde de *Litopenaeus vannamei*: comederos y voleo. Memorias del V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil, Ecuador.
- Molina C. y Lucas M. 2007. Manual de ingredientes protéicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editores: Tsai García Galano, Humberto Villarreal-Colmenares y Jorge L. Fenucci. Editorial Universitaria de Mar del Plata. Argentina.
- Núñez, C., Salas, M., García, A., Mendoza, G., Plata, F., Cervantes, M., Viana, T. Y Morales, A. 2009. Efecto de una fitasa en la digestibilidad y actividad de tripsina y quimotripsina en cerdos destetados. Archivos Zootecnicos. 58:2-6.
- Nwanna, L., Eisenreich, R. y Schwarz, F. 2007. Effect of wet-incubation of dietary plant feedstuffs with phytases on growth and mineral digestibility by common carp (*Cyprinus carpio* L).I: 10.1016/j. Aquaculture. 2007. 04.020.
- Ortiz, 2009. Efecto de concentrados proteicos vegetales sobre la digestibilidad aparente y la fisiología enzimática digestiva del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de grado. Universidad Autónoma de Campeche.
- Pastor-Díaz, M.G., 2001. Engorda de camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) en Campeche. Memorias del III foro del camarón del Golfo de México y del Mar Caribe. Instituto Nacional de Pesca.
- Peers, F. The phytase of wheat. Biochem J 1953; 53: 103-10.
- Phillippy B. 1999. Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* Phytases to inactivation by gastrointestinal enzymes. J. Agric. Food Chem. 47, 1385-1388.
- Phromkunthong, W., Gabaudan, J. (2006). Used of microbial phytase to replace inorganic phosphorus in sex-reversed red tilapia: 1 dose response. J. Sci. Technol., 28(4): 731-743.

- Ramirez-Rodriguez, M., Chávez, E. Y Arreguin, F. 2000. Perspective of the pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum* Burkenroad) fishery of Campeche bank, Mexico. *Ciencias Marinas*. 26: 97–112.
- Ramos R., Miranda, I. Y Molina, C. 2001. Consumo y digestibilidad aparente de tres ingredientes marinos locales incorporados en dietas prácticas para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Estud. Oceanol.* 20: 43-50.
- Rebollar, P.G. y Mateos, G. G. 1999. 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. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Eds.: P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Madrid, España.
- Ricque-Marie D, Cruz-Suarez LE, Zavala-Chavez BM, Nieto-Lopez M, Guajardo C, Tapia-Salazar McCallum IM and Newkirk R. 2004. Effect of a phytase product on protein and phosphorus digestibility in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed an air classified pea protein flour (Ppf) based diet. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Rosas, C., Sánchez, A., Gallardo P., Quiroz, J., Gaxiola, G.Y Díaz E. 1995. Oxygen consumption and ingestion rate of *Penaeus setiferus* larvae fed *Chaetoceros ceratosporum*, *Tetraselmis chuii* and *Artemia* naupli, *Aquaculture Nutrition Blackwell Science USA*. pp. 13-20.
- Samocha, T., M., A. Rojas, Ray Sutter, Addison L. Lawrence and Frank L. Castille. 1997. Production of Bait A shrimp *Penaeus setiferus* and *P. duorarum* in Texas using raceways and ponds. *Resumen, Taes Srmp Mariculture Reserch, Corpus Cristy TX. USA*. 468 pp.
- Smith, D.M., Allan, G.I., William, K.C. y Barlow, C.2000. Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México, pp. 277-286.

- Smith, D.M., Tabrett, S.J., Barclay, M.C., Irvin, S.J. 2005. The efficacy of ingredients included in shrimp feeds to stimulate intake. *Aquacult. Nutr.* 11, 263-272.
- Soria, F., Mariscal, G., Gómez, S., Cuarón, J. 2009. Efecto de la adición de enzimas fibrolíticas y una fitasa para cerdos en crecimiento sobre la digestibilidad de nutrientes. *Tèc. Pecu. Méx.* 47:1-14.
- Storebakken, T., Shearer, K.D., Roem, A.J., 1998. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmosalar*. *Aquaculture* 161, 365–379.
- Suárez, J.A., (2008). 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 grado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Tacon, A. 2008. Compound aqua feeds in a more competitive market: alternative protein sources for a more sustainable future. pp.1-55. Editores: En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto, M., Lazo, J. y Viana, M. *Avances En Nutrición Acuícola IX Simposio Internacional De Nutrición Acuícola.* 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma De Nuevo León, Monterrey, México.
- Tacón, A.G.J., Foster, I.P. 2000. Global trends and challenges to aquaculture and aquafeed development in the new millennium. *International Aquafeed Directory and Buyers' Guide*, pp. 4-25.
- Tacon, A.G.J., Haaster, J.V., Featherstone, P.B., Kett, K. y Jackson, A.J. 1983. Studies on the utilization of full-fat soybean and solvent extracted soybean meal in a complete diet for rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49: 1437-1443.
- Taussky, H.H., Shorr, E., 1953. A micro colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *Journal Biological Chemistry.* 202, 675-685.
- Toledo S. y García M. 2000. Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe. *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium*

- Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18. La Paz, B.C.S., México. pp. 83-137.
- Ullah A., Sethumadhavan K., y Mullaney E. 2008. Salt effect on the pH profile and kinetic parameters of microbial phytases. *J. Agric. Food Chem.* 2008, *56*, 3398–3402.
- Vallardi, M. 2000. Efecto de la fitasa en dietas para gallina de postura como fuente de energía aminoácidos y fósforo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Colima. Colima, México.
- Viader-Salvadó, J.M., Gallegos-López, J.A., Carreón-Treviño, J.G., Castillo-Galván, M., Rojo-Domínguez, A., Guerrero-Olazarán, M. 2010. Design of thermostable beta-propeller phytases with a broad range of pH activity and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(19): 6423–6430
- Viveros, A., Arija, I., Centeno, C. Y Brenes, A. 2002. Efecto de la administración de fitasas de origen vegetal y microbiano sobre la utilización del fósforo en pollos *broilers*. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Animal.* 17:1-12.
- Vohra, A. y Satyanarayana, T. 2003. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications, *Critical Reviews in Biotechnology.* 23:1- 60.

X. ANEXOS

ANEXO 1. MÉTODO DE AIA

Método de Acid Insoluble Ash (Cho and Slinger, 1979) usando como marcador la zeolita (Cuzon, 1998).

1. Se pesan las cápsulas (C) de porcelana y se registra cada uno de ellos.
2. A continuación se muelen las muestras de heces (H) y alimento (S) finamente.
3. Se pesan C + S o H y se registran los valores.
4. Se colocan las muestras en la estufa de desecación a 60 °C durante 24 hrs a continuación se vuelven a pesar y se toman los pesos secos verdaderos.
5. Se calcula el % de humedad existente en las muestras.
6. A continuación las muestras son colocadas en una mufla a 500 °C durante 4 horas.
7. Se colocan las muestras en un desecador y se espera que alcance la temperatura ambiente.
8. Se pesan nuevamente y se registran los pesos.
9. Se calcula el % de cenizas.
10. A continuación la cenizas son colocadas (de manera individual) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se agregan 100 ml de HCl al 4 M (en campana de extracción).
11. El matraz se pone a hervir durante media hora (en campana de extracción).
12. Después el contenido del matraz es filtrado en papel Waltman No. 40 libre de cenizas con ayuda de un matraz Kitasato o con una cámara de filtrado.
13. Los papeles serán colocados en la cápsula de porcelana original de la muestra correspondiente.
14. Seguidamente se colocan las muestras en la mufla a 500 °C durante toda la noche.
15. 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.
16. Calcular el % de zeolita de la muestra.

ANEXO II. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN ALIMENTO Y HECES DE CAMARÓN.

Principio

En este método se agrega una solución de molibdato-ácido ascórbico a la dilución de las muestras obtenidas para reducir el complejo ácido y formar un complejo azul $[(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4]$ entre el fosfato y el molibdato de amonio en presencia ácido ascórbico como agente reductor. La intensidad del color azul es medida en un espectrofotómetro de Microplaca 800 nm.

Soluciones requeridas

- a) Acido hidrociorhídrico concentrado
- b) Acido sulfúrico concentrado
- c) Solución de molibdato de amonio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): Mezclar 140 ml de ácido sulfúrico con 300 ml de H_2O en un matraz volumétrico de 500 ml. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 12.5 g de molibdato de amonio. Completar el volumen con H_2O . Mezclar bien.
- d) Acido ascórbico: Disolver 5 g de ácido ascórbico en H_2O en un matraz de 100 ml. Completar el volumen con H_2O . Mezclar bien.
Nota: Preparar las soluciones el mismo día que se vayan a usar.
- e) Solución de molibdato-ácido ascórbico: Inmediatamente antes de usar, agregar 25 ml de la solución de molibdato de amonio y 10 ml de ácido ascórbico y diluir con agua en un matraz volumétrico de 100 ml. Mezclar bien.
- f) Solución estándar de fosfato: Secar fosfato de potasio dihidratado o trihidratado (KH_2PO_4) durante el tiempo necesario hasta lograr peso constante. Pesar exactamente 0.136 g y aforar a 100 ml con agua destilada.

- g) Curva de calibración (0.0625, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000 mg/L P): Agregar 10 ml de la solución estándar de fosfato en el tubo marcado con 1.000 mg/L P, al resto de los tubos se debe agregar 5 ml de agua destilada. Transferir 5 ml del tubo con estándar al tubo que le antecede, y hacer lo mismo de manera escalonada hasta tomar del último tubo 5 ml, los cuales deberán desecharse. Al final, los tubos deben quedar con un volumen de 10 ml; agregar finalmente a cada tubo 0.5 ml de la solución molibdato-ácido ascórbico y esperar 60 minutos para realizar la lectura.

Procesamiento de las muestras

Fósforo total

Pesar 200 mg de muestra a procesar y meter a mufla a 550°C durante 2 horas, colocar en un desecador para enfriar las muestras. Agregar 2 ml de ácido clorhídrico en el crisol con cenizas y verter cuidadosamente en un matraz volumétrico de 100 ml, enjuagar el crisol con 10 ml de agua destilada calentada previamente a 80 °C, con el fin de arrastrar las cenizas que puedan quedar en el crisol; aforar el matraz con agua destilada.

Tomar 1 ml de la solución madre y colocar en un tubo de ensayo y agregar 9 ml de agua destilada para obtener un volumen final de 10 ml. Agregar finalmente 0.5 ml de la solución de molibdato-ácido ascórbico y esperar 1 hora para realizar la lectura.

Fósforo libre

Pesar 200 mg de muestra y colocar en tubos CORNING® y agregar 10 ml de agua destilada. Dejar en agitación constante durante 12 horas para permitir que las muestras se disuelvan perfectamente y lograr la mayor cantidad posible de ortofosfato. Posteriormente, centrifugar las muestras a 5000 RPM durante 10 minutos y tomar 2 ml de sobrenadante y

colocarlos en tubos Eppendorf® para centrifugar nuevamente a 13,000 RPM por 10 minutos más.

A continuación, tomar 1 ml del sobrenadante final obtenido y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua destilada. Tomar ahora 5 ml de la solución madre obtenida y agregar 0.5 ml de la solución de molibdato-ácido ascórbico y esperar 60 minutos para realizar la lectura.

Determinación

Transferir las soluciones finales obtenidas a una placa para lector de ELISA (por triplicado para los valores de la curva y para las muestras a procesar), agregar un blanco con agua destilada también por triplicado para restar su absorbancia con la de las muestras procesadas para así obtener la absorbancia final de cada muestra. Hacer la medición en el espectrofotómetro con una absorbancia de 800 nm.

Si la absorbancia de las muestras procesadas excede la absorbancia obtenida en 1.000 mg P/L, hacer una dilución de la muestra para repetir la lectura.

Cálculos

Calcular la concentración de fósforo en las muestras procesadas utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde:

V_1 : Volumen de la solución usada en la reacción de color (ml).

V₂: Volumen del matraz volumétrico que contiene la muestra de cenizas (100 ml).

P: Cantidad de fósforo a partir de la curva estándar correspondiente a la absorbancia de la muestra (mg).

W: Peso de la muestra utilizada (mg).

ANEXO III. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Procedimiento:

- 1.- Pesado de la muestra: Pesar muestra equivalente a 10 mg de proteína
- 2.- Adición del estándar interno "SI": Añadir 40 μ l de estándar interno (Acido 2-aminobutirico, AABA 0.25 M).
- 3.-Evaporacion del HCl del SI añadido a la muestra en la estación de trabajo Pico-tag.
- 4.- Hidrólisis ácida de la muestra: Adicionar 200 μ l de HCl 6 N por cada muestra, dejando el vial de reacción con nitrógeno, por 20 horas a 108°C.
- 5.-Reconstitución y limpieza de la muestra: Llevara sequedad las muestras de hidrólisis a 70°C bajo corriente de nitrógeno (max. 5 PSIG de presión). Una vez secas, reconstituir la muestra con 1 mL de HCl 20 mM.
- 6.-Recuperacion demuestras: Tomar 10 μ l del hidrolizado ácido de la muestra, transferirlo a un vial de 3 mL y diluirlo con 990 μ l de HCl 20 mM.
- 7.-Derivatización de las muestras: Añadir 10 μ l de muestra a 70 μ l de buffer boratos (2C, AQC Fluor Reagent Kit), a un vial de 2 mL con 20 μ l de derivatizante (2ª, AQC).
- 8.-Inyección de las muestras: a) Línea base del sistema: Inyectar la segunda muestra control, solo si aparece algún pico con señal mayor a 1 mV. b) Estándar interno: Inyectar la segunda muestra control, solo si aparece un pico con retención 27 con señal de 45 mV. c) Punto medio de la curva (40 μ l en 2.5 mM de 18 aa, y 1.25 de cisteína): Inyectar la muestra control, solo si al interpolar el ABCaa/ABCsi en la curva estándar se obtiene un valor de 100 pM \pm 5. d) Inyectar las muestras en HPLC
- 9.-Reporte: De los cronogramas se obtienen la relación de ABCaa/ABCsi, y se interpolan en la curva estándar de cada aminoácido. La interpolación de la concentración de cada aminoácido, el factor de dilución y el peso molecular de cada aminoácido dan la cantidad en mg en 10 mg de muestra.

Características del equipo:

*Sistema de bombeo Dual (Binary HPLC Pump) Waters 1525.

*Detector de fluorescencia de onda multiple Waters 2475, $\lambda_{exc}=250nm, \lambda_{emss}=395$ nm.*Automuestreador marca Jasco.

*Estación de trabajo Dell Optiplex 2475, con el sistema Breeze de Waters.

*Columna: ACCQ-.TAG Waters, 3.9X 150 mm, 4 μ m.

*Fase A: Eluente A Waters.

*Fase B: Acetonitrilo: Agua (60: 40 v/v).

*Flujo: 1 mL/min.