



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

Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510
Teléfono y Fax: (52-55) 56-22-58-03, 5829, 5990 y 5991
Correo electrónico: posgrado@mar.icmyl.unam.mx
http://www.unam.mx/ciencias_del_mar_posgrado



Evaluación de concentrados proteicos vegetales en la
nutrición de *L. vannamei*: aspectos de digestibilidad,
fisiológicos, bioquímicos y calidad.

T E S I S

DOCTOR

Biología Marina

P r e s e n t a

M. en C. MALDONADO FLORES JUAN CARLOS

Director de Tesis: **DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS**

Comité Tutorial

DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTÍZ

DRA. JOSAFAT MARINA EZQUERRA BRAUER

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

DRA. EMMA JOSEFINA FAJER ÁVILA

Mérida Yucatán México

16 de Mayo del 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.

COMITÉ TUTORIAL Y DE REVISIÓN DE TESIS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias UMDI Mérida, Yucatán

DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTÍZ

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias UMDI Mérida, Yucatán

DRA. JOSAFAT MARINA EZQUERRA BRAUER

Universidad de Sonora DIPA Hermosillo, Sonora

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

Universidad Nacional Autónoma de México Dep. de Bioquímica Fac. de Medicina
México, D.F.

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán
Dep. en Acuicultura y Manejo Ambiental

Dedicatorias

A mi madre que siempre está a mi lado

Herminia Flores Chavira

A mi hermana por su apoyo incondicional y su gran apoyo.

Herminia Maldonado Flores

Y sobre todo a lo más maravillo de mi vida, que será el motivo y la fuerza para vivir.

Mi hijo.

Agradecimientos

A Dios

A mi tutora por todo el apoyo y respaldo ofrecido dentro y fuera de la institución.

A mi comité por el apoyo constante en el trabajo.

Al Dr. Gerard Cuzon por todo el tiempo dedicado a este trabajo.

A mi madre por confiar siempre en mí, y darme todo su amor.

A mi hermana por su gran apoyo.

A Jack por todo el apoyo y cariño en los momentos más difíciles de este camino.

Al buen Andrés por ser parte fundamental del caminar en Mérida.

A Mauricio por su motivación.

A mi hermano, Salvador por todo el apoyo en la Ciudad de México.

A Carmen y Joel por sus buenos consejos.

A Xavier Chippa por su ejemplo.

A la gente que me acompañó en esta formación como fue el buen Sara, Alex, Aleja, Pana, Arturo, J. Gamboa y Celio.

Y en especial a Karina por hacerme mejor ser humano día a día.

Proyecto CONACYT

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, UNAM. con sede en Sisal, Yucatán bajo la dirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, y con la asesoría del Dr. Gerard Cuzon, con el apoyo financiero de los proyectos PAPIIT 214506 y CONCAyT 49406.

Se agradece su participación en el proyecto a los técnicos académicos Ing. Miguel Arévalo, Biol. Gabriela Palomino, Ing. Adriana Paredes, Biol. Manuel Valenzuela, M. en C. María de Carmen Galindo y la M. en C. Maribel Badillo por su apoyo en las diferentes etapas de este trabajo.

Resumen

La camaronicultura enfrenta varios retos entre ellos la búsqueda de insumos alternativos a la harina de pescado y calmar, una de estas alternativas son los productos de origen vegetal. En este trabajo se evaluó la respuesta del camarón *L. vannamei* a diferentes ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína alternativas a la harina de calamar de los alimentos balanceados. El estudio se dividió en tres grandes fases. Los ingredientes estudiados fueron: pasta de soya, harina de trigo, gluten de trigo, concentrado proteico de soya, concentrado proteico de papa, *Spirulina* de Yucatán, *Spirulina* comercial, concentrado proteico de pescado, harina de pescado y harina de calamar chilena. Los ingredientes a evaluar en un estudio in vivo fueron seleccionados mediante un análisis in vitro (Grado de Hidrólisis, GH). Los resultados obtenidos indicaron diferencias significativas en el GH ($p < 0.05$). El mayor GH lo presentó la pasta de soya (19.4%). Valor incluso mayor que las fuentes de origen animal marino (12.5%, y mucho mayor que las demás fuentes de proteína vegetal (7.8%). Las dietas elaboradas a partir de estos ingredientes fueron soya (D1), trigo (D2), papa (D3), *spirulina* (D4), cóctel vegetal (D5) y calamar (D6). Las dietas fueron analizadas in vitro (GH) e in vivo. Los valores de GH más elevados se obtuvieron en D5 (2.0%) y D6 (1.6%) ($p < 0.05$), seguidos de las D4 (1.0%) y D2 (1.2%), mientras que los valores más bajos se presentaron en D3 (0.75%) y D4 (0.83%). La adaptación bioquímica de los camarones hacia las dietas se midió la actividad específica de tripsina y quimotripsina extraídas del hepatopáncreas de los organismos. Al comparar las dietas D1, D2 y D3, la actividad de quimotripsina no se vio afectada, pero sí la de la tripsina, la mayor actividad ($p < 0.05$) se presentó en los organismos alimentados con D2 (16.5 U/mg proteína), sin detectarse diferencias entre D1 (7.8 U/mg proteína) y D3 (10.1 U/mg proteína) ($p > 0.05$). En los organismos alimentados con D4, D5 y D6 no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) tanto en las actividades de tripsina y quimotripsina. La distribución de energía se calculó mediante el balance bioenergético. Al analizar los organismos alimentados con las dietas D1, D2 y D3 no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) en la respiración de rutina (HeE); en cuanto al incremento de calor aparente (HiE) el menor valor se obtuvo en los camarones alimentados con D1 (64.9 %) y los más altos fueron con D2 (99.4%); con respecto a la energía retenida (RE), el valor más alto lo arrojaron los organismos alimentados con D1 (73.2%) y los más bajos con D2 (55.4%) y D3 (45.5%). Al evaluar los tratamientos D4, D5 y D6, los valores más elevados de HeE lo arrojaron los alimentados con D6 (103.3%), seguidos de los D5 (93.5%) y el más bajo los D4 (53.2%); observándose un patrón inverso el HiE, D4 (53.2%) > D5 (22.4%) > D6 (19.8); y en cuanto a la RE no se detectaron diferencias entre los tratamientos. La respuesta fisiológica de los organismos ante las condiciones ambientales, incluido el alimento evaluado, además del balance energético, que en general es positivo, se vio reflejada en las tasas de supervivencia y crecimiento observados. El porcentaje de supervivencia fue bueno independiente de la dieta, D1 (98%), D2 (97%), D3 (96%), D4 (91%), D5 (91%) y D6 (90%). El crecimiento sí se vio afectado ($p < 0.05$) por la dieta. El mayor crecimiento se presentó en los organismos alimentados con D1 (1.1 g), sin detectarse

diferencias entre D2 (0.88 g) y D3 (0.85 g). Al evaluar las dietas D4, D5 y D6. El menor crecimiento lo presentaron los del D5. La información anterior se usó de base para la tercera fase del estudio, el cual a su vez se dividió en dos etapas más. En ambas se evaluaron dos dietas, dieta vegetal mejorada (DVM) y dieta harina de calmar (DC). En la primera etapa se estudiaron organismos desde post-larva hasta juveniles tempranos. En la segunda se trabajó con juveniles tempranos hasta juveniles tardíos. La actividad de la tripsina no fue afectada ni por la dieta ni por el estadio evaluado. Se detectaron diferencias en la actividad de la quimotripsina en la segunda fase, por efecto de la dieta, más no en la primera fase. En relación al balance energético, en la primera etapa no se detectaron diferencias por efecto de la dieta. En la segunda etapa, donde los valores más altos de HeE los arrojaron los alimentados con DVC, y en lo relacionado con HiE y RE estos fueron mayores en los DC. El crecimiento en la primera etapa no se vio influenciado por la dieta, pero sí en la segunda etapa. El mayor crecimiento lo arrojaron aquellos alimentados con DC, así como una mejor supervivencia. En cuanto a la calidad post-cosecha del camarón la dieta no afectó la actividad de la colagenasa, ni la resistencia al corte. *L. vannamei* mostró una adaptación positiva a la inclusión de fuentes proteicas de origen vegetal, por lo que es factible la inclusión de estos insumos en el cultivo de estos organismos. En base a los anteriores resultados se concluye que la adaptación de *L. vannamei* a diferentes fuentes de origen vegetal es factible.

Introducción.

Dado que la supervivencia y funcionamiento de los organismos depende de la disponibilidad ambiental del alimento. Existe una dependencia de los mecanismos bioquímicos a los nutrientes. En este sentido los nutrientes pueden influenciar el desarrollo de determinado genotipo y fenotipo de los individuos (Paoloni *et al.*, 2003). Es por esta razón que las condiciones de cultivo en la acuicultura juegan un papel muy importante, la alimentación es un factor crucial pues se ha observado que los cambios en el peso, la talla y la textura del tejido están relacionados con características del alimento, como la concentración y tipo de proteína en la dieta (Ezquerro *et al.*, 2003).

Las proteínas son los componentes más caros en los alimentos de organismos acuáticos, es por esto que la búsqueda de otras fuentes de proteínas de gran calidad nutricional sea la tendencia actual (Akiyama *et al.*, 1991).

Para la nutrición del camarón es necesario que estas fuentes de proteína presenten valores altos de digestibilidad (Sarac *et al.*, 1994; Sudaryono *et al.*, 1995); ya que una dieta puede parecer una excelente fuente de nutrientes debido a su composición química, pero su valor nutritivo estará en función de que los nutrientes pueda ser digeridos y absorbidos por el animal (Akiyama *et al.*, 1991; Sudaryono *et al.*, 1996).

Tradicionalmente en la elaboración de los alimentos de alto rendimiento para el cultivo de camarón se han empleado fuentes de proteína de origen animal marino. Una fuente de proteína marina que ha demostrado tener un alto valor nutritivo para el camarón es el calamar, al cual se le atribuyen propiedades especiales (Cruz-Suárez, *et al.*, 1992) que lo convirtieron en un ingrediente indispensable en los alimentos balanceados de alto rendimiento, tanto para los juveniles como para los reproductores (Kanazawa *et al.*, 1985).

En paralelo, desde hace ya varias décadas, en la industria de la fabricación de alimentos balanceados para camarón, se han empleado fuentes de proteína vegetal, (Tacon, A.G.J. 1993, Tacon, A.G.J. 1997). Muy diversas materias primas de origen vegetal (harina de soya, harina de chícharo, pasta de soya, gluten de trigo, etc) han sido usadas para sustituir la harina de pescado para abaratar los costos de producción del cultivo de camarón. La posibilidad de la inclusión de estas materias primas se debió esencialmente a una de las especies más herbívoras *L. vannamei*.

Resultados recientes de nuestro grupo de trabajo (Cuzon, *et al.*, 2003, Jiménez-Yan, 2004, Gaxiola *et al.*, 2005, Maldonado 2007 y Maldonado *et al.*, 2009), han mostrado que en la fase postlarval, *L. vannamei* no presenta supervivencias y crecimientos significativamente diferentes con alimentos en los que se ha sustituido hasta un 90% la proteína de origen animal marino por combinaciones de fuentes de proteína de origen vegetal.

Este trabajo sirve como referencia y antecedente del papel regulador de los nutrientes en el desempeño de los animales. Por lo anteriormente señalado, coincidiendo con la tendencia contemporánea y respondiendo a las necesidades del cultivo y comercialización de los camarones, la caracterización de información de los mecanismos bioquímicos relacionados con el metabolismo de proteínas, el crecimiento y la textura del producto final asociados a distintas fuentes de proteína, son el blanco del presente trabajo.

Objetivo General.

Conocer el efecto de fuentes convencionales y alternativas de proteína dietética en la evaluación de concentrados proteicos vegetales en la nutrición de *L. vannamei* en aspectos de digestibilidad, fisiológicos, bioquímicos y calidad.

Objetivos Particulares.

Evaluar el efecto de fuentes de proteínas convencionales como el calamar en el crecimiento, supervivencia, digestibilidad aparente y balance bioenergético de *L. vannamei*

Evaluar el efecto de dietas elaboradas con concentrado proteico de soya, gluten de trigo, concentrado proteico de papa y *Spirulina* y un coctel en el crecimiento, supervivencia, digestibilidad aparente y balance bioenergético de *L. vannamei*

Contrastar la expresión fenotípica de la tripsina y quimotripsina hepatopancreática de los camarones alimentados con dietas alternativas elaboradas con concentrado proteico de soya, gluten de trigo, concentrado proteico de papa, *Spirulina sp.*, un coctel vegetal y calamar.

Evaluar el colágeno como un marcador molecular asociado a la textura del músculo de la cola de *L. vannamei* alimentados con dietas alternativas de concentrado proteico de soya, gluten de trigo, concentrado proteico de papa, *Spirulina*, un coctel vegetal y calamar.

Hipótesis.

Los requerimientos nutricionales de diferentes etapas de cultivo del camarón *L. vannamei*, serán satisfechos con proteína de origen animal, al igual que con concentrados proteicos de origen vegetal.

Metodología.

Para lograr lo antes mencionado se dividirá el estudio en 3 etapas:

Etapas 1: Evaluara la digestibilidad *in vitro* de insumos de origen vegetal y Dietas con concentrados proteicos de origen vegetal para *L. vannamei*.

Etapas 2: Evaluar la digestibilidad *in vivo* de dietas con fuentes de proteína vegetal y una dieta con una fuente de proteína animal marina en los juveniles de *L. vannamei*.

Etapas 3: Evaluar las diferentes fuentes alternativas de proteína previamente analizadas en una sola dieta vs. una dieta control en un experimento de crecimiento de largo periodo. (Post-larvas (D. control vs. D. Vegetal mejorada) y juveniles (D. Control vs. D. Vegetal Mejorada)).

Tabla de contenido

Dedicatorias	3
Agradecimientos.....	4
Resumen	6
Introducción.....	8
Objetivo General.....	9
Objetivos Particulares.....	9
Hipótesis.....	10
Metodología.....	10
Tabla de contenido.....	11
Capítulo 1.	14
Evaluación <i>in vitro</i> de los ingredientes y de las dietas con concentrados proteicos de origen vegetal y animal marina para <i>L. vannamei</i>.	14
1.- Introducción.....	14
2.-Hipótesis.....	16
3.- Objetivos.....	16
Objetivo general 1	16
Objetivo general 2	16
3.1.- Objetivos particulares.....	16
3.1.1- Primer objetivo particular	16
3.1.2.- Segundo objetivo particular	16
4.- Materiales y Métodos	17
4.1.-Origen de los juveniles.....	17
4.2.-Determinación de digestibilidad <i>in vitro</i> (pH-stat).....	17
4.3.-Formulación de Dietas.....	18
4.4.-Método de elaboración de las Dietas.....	18
5.-Análisis estadísticos	18
6.- Resultados.....	20
6.1.-Digestibilidad <i>in vitro</i> de los ingredientes.	20
6.2.- Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas.	20
7.-Discusión.	22
Digestibilidad <i>in vitro</i> de los ingredientes.	22
Soya.....	22
Trigo	23
Papa	24
Spirulina	24
Harina de Pescado.....	25
Harina de Calamar.....	25
Digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas	26
8.- Conclusiones	29
Capítulo 2	30
Evaluación de dietas con proteína de origen vegetal y una proteína animal marina en juveniles de <i>L. vannamei</i>.	30
1.- Introducción.....	30
2.- Hipótesis.....	32
3.- Objetivo general.....	32

3.1.- Objetivos particulares del Experimento I	32
3.2.- Objetivos particulares del Experimento II.....	32
4.- Materiales y Métodos	32
4.1.- Diseño experimental	32
4.2.- Composición de las dietas.....	33
4.3.- Método de elaboración de las dietas experimentales.....	35
4.4.- Descripción del dispositivo y condiciones de manejo de ambos experimentos	35
4.5.- Ración alimenticia para ambos experimentos.....	35
4.6.- Parámetros evaluados en ambos experimentos	36
4.6.1.- Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA).....	36
4.6.2.- Indicadores fisiológicos.....	36
4.6.4. Análisis de calidad del producto	38
5.- Análisis estadísticos	39
6.- Resultados.....	40
6.1.- Experimento I.....	40
6.1.1.- Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA).....	40
6.1.2.- Indicadores fisiológicos.....	40
6.1.4. Análisis de calidad del producto	44
6.2.- Experimento II	45
6.2.1.- Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA).....	45
6.2.2.- Indicadores fisiológicos.....	45
6.2.4. Análisis de calidad del producto	48
7.- Discusión	51
Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA).....	51
Indicadores fisiológicos	57
Análisis de calidad del producto	64
8.- Conclusiones	66
Capítulo 3. Experimento de crecimiento.	67
Postlarvas (D. Animal VS. D. Vegetal) y juveniles (D. Animal VS. D. Vegetal).	67
1.- Introducción.....	67
2.- Hipótesis.....	68
3.- Objetivos.....	68
Objetivos generales	68
3.1.- Objetivos particulares del Experimento I	68
3.2.- Objetivos particulares del Experimento II.....	68
4.- Materiales y Métodos.	68
4.1.- Diseño experimental de ambos experimentos.....	68
4.2.- Composición de las dietas.....	69
4.3.- Método de elaboración de las dietas experimentales.....	69
4.4.- Descripción del dispositivo y condiciones de manejo de ambos experimentos.	70
4.5.-Ración Alimenticia para ambos experimentos.	70
4.6.- Parámetros a Evaluar en ambos experimentos.....	70
4.6.1.-Indicadores fisiológicos.....	70
5.- Análisis estadísticos.	73
6.- Resultados.....	74
6.1.- Experimento I.....	74
6.1.1 Indicadores Fisiológicos.....	74
6.2.- Experimento II	76
6.2.1.- Indicadores Fisiológicos.	76
7.- Discusión	79

Conclusiones y Recomendaciones Generales	90
ANEXO A.....	92
ANEXO B.....	96
Glosario.....	97
Glosario de abreviaciones	99
Lista de tablas.....	100
Lista de figuras	102
Bibliografía.....	104

Capítulo 1.

Evaluación *in vitro* de los ingredientes y de las dietas con concentrados proteicos de origen vegetal y animal marina para *L. vannamei*.

1.- Introducción.

Los estudios sistemáticos de nutrición en camarones peneidos iniciaron en la década de los 70's del siglo XX, mediante la definición de los requerimientos nutricionales de algunas especies de camarón, es así que surge el interés por las dietas artificiales (Ramos *et al.*, 2001). Con el tiempo la demanda de ingredientes ha incrementado, especialmente las fuentes proteicas empleadas en la elaboración de las dietas, debido a factores sociales y ambientales. Estos factores han llevado a la necesidad de buscar fuentes alternativas de proteína, que cumplan con las demandas tanto cuantitativas como cualitativas de los nutrientes, además de presentar la capacidad de ser ingeridas, digeridas y absorbidas en las cantidades adecuadas por los organismos de estudio, características de los alimentos que se han vuelto cada día más demandadas (Akiyama *et al.*, 1991).

Desde el principio las dietas artificiales, se han basado en fuentes proteicas de origen animal marino, pero considerando la presión actual que hay sobre los recursos provenientes del mar, es necesario el estudio de fuentes alternativas, que permitan remplazar las fuentes proteicas de origen animal marino sin afectar los principales parámetros productivos de la industria (Suárez, 2008; Suárez *et al.*, 2009).

Es a partir de esta búsqueda de fuentes proteicas alternativas, que surge el interés por las proteínas de origen vegetal, de conocer más sobre su contenido nutricional y de la digestibilidad de los nutrientes. Este reto de conocer más sobre insumos de origen vegetal es una tarea fundamental para el mejor desarrollo de las dietas (Ramos *et al.*, 2001).

El estudio sobre la digestibilidad de las proteínas es esencial, pues permite formular dietas a bajo costo, además de ser muy útil para la investigación de requerimientos nutricionales, selección de ingredientes con valor nutritivo alto (en relación a la calidad de la materia prima) y formulación de dietas que minimicen la contaminación del agua (Hajen *et al.*, 1993).

Existen diversos métodos para evaluar la digestibilidad de las fuentes de proteína: la

digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad aparente o *in vivo*. El método de digestibilidad *in vitro* permite conocer el potencial de digestión de la proteína por parte de los camarones (Cordova-Muruta *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2004), en la actualidad la tendencia es sustituir la enzima o el sistema multienzimático de origen mamífero o de microorganismos (Hsu *et al.*, 1977), por enzimas del organismo con el que se trabaja (Forrellat, 1998; Ezquerria *et al.*, 2003), para así tener una mejor comprensión de la función de las enzimas sobre el sustrato o dieta de estudio.

Los métodos *in vitro* tienen características positivas como son: rapidez y valores aproximados de la digestibilidad (Ezquerria *et al.*, 1997), además de ser económicos a comparación de los métodos *in vivo* (Grabner, 1985).

Las desventajas del método de digestibilidad *in vitro* es que la proteína se calcula a partir del consumo de NaOH, producto de la liberación de protones que pueden ser de diferente origen. A pesar de lo cual se han propuesto como una alternativa a los métodos *in vivo*, como indicadores de la calidad nutricional de un producto (Ezquerria *et al.*, 2004).

El pH stat es uno de los métodos más eficientes y tiene el potencial para poder estimar la digestibilidad *in vitro* trabajando con varios insumos y dietas para camarón (Ezquerria *et al.*, 1998).

En el caso de *L. vannamei* que presenta hábitos alimenticios omnívoros oportunistas con tendencia a la herbivoría (Lovett y Felder, 1989 y 1990 a, b y c), tenemos que presentan en el hepatopáncreas una gran gama de enzimas proteolíticas con capacidad de digerir tanto la proteína animal, como vegetal, lo cual se evidenciará a través de la tasas de hidrólisis proteica *in vitro* de diferentes fuentes de origen vegetal, comparadas con fuentes proteicas de origen animal marino, además de una serie de dietas elaboradas con ingredientes de origen vegetal y animal marino.

Referente a los estudios que se tienen para camarón se ha logrado incorporar diferentes fuentes proteicas tales como la harina de soya, la harina de chícharo, la pasta de soya, y el gluten de trigo en alimentos balanceados, con resultados positivos (Cruz-Suárez *et al.*, 2001); Pero aún falta hacer estudios de otros insumos y dietas, interés que se expone en la presente investigación.

2.-Hipótesis

Las enzimas hepatopancreáticas de *L. vannamei* mostrarán la misma capacidad de hidrolizar las fuentes y dietas de origen vegetal que las fuentes y dietas de origen animal marino.

3.- Objetivos

Objetivo general 1

Determinar el grado de hidrólisis y la digestibilidad *in vitro*, de diversos ingredientes vegetales y de origen animal marino, empleando homogenizados de hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei*.

Objetivo general 2

Determinar el grado de hidrólisis de dietas elaboradas en base a una fórmula de referencia, la cual se combinó en una razón 70/30% con fuentes proteicas vegetales por separado y un coctel vegetal, para ser comparados contra la proteína de origen animal marino.

3.1.- Objetivos particulares

3.1.1- Primer objetivo particular

Determinar la digestibilidad *in vitro* de los siguientes ingredientes: pasta de soya (PS), gluten de trigo (GT), harina de trigo (HT), concentrado proteico de papa (CPPa), concentrado proteico de soya (CPS), *Spirulina* Yucateca (Esp1), *Spirulina* comercial (Esp2), concentrado proteico de solubles de pescado (CPSP⁷⁰), harina de pescado (HP) y harina de calamar (HCal).

3.1.2.- Segundo objetivo particular

Determinar la digestibilidad *in vitro* de dietas con: concentrado proteico de soya (D1), gluten de trigo (D2), concentrado proteico de papa (D3), *Spirulina* (D4), dieta de coctel vegetal (compuesta por las cuatro fuentes de proteína vegetal anteriores) (D5) y una dieta en la que se incluyó calamar como principal fuente de proteína de origen animal marino (D6).

4.- Materiales y Métodos

4.1.-Origen de los juveniles

Los juveniles de *L. vannamei* con un peso de 6.5 ± 0.8 g se obtuvieron de los estanques exteriores de la UMDI Sisal, Yucatán, provenientes de un desove múltiple, los cuales fueron alimentados con una dieta comercial al 30% de proteína de origen animal.

4.2.-Determinación de digestibilidad *in vitro* (pH-stat).

Medición de la tasa inicial de hidrólisis (Nieto *et al.*, 2005).

Para la determinación del grado de hidrólisis por el método de pH-stat, se obtuvieron las enzimas de un conjunto de organismos de *L. vannamei*, a los cuales se les extrajo el hepatopáncreas e inmediatamente fue congelado en nitrógeno líquido y después conservado a -40° C. Los hepatopáncreas fueron triturados en buffer TRIS-HCL 10 mM pH 8 a 4° C (0.307 g de tejido en 100ml), con la ayuda de un ultra-triturador. El triturado se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min. a 4° C, y así se obtuvo un homogeneizado enzimático.

El grado de hidrólisis se determinó por triplicado, tanto para los ingredientes, como para las dietas, las muestras de los ingredientes y dietas se pasaron por un tamiz de 250 μ m y fueron homogenizadas en 5 ml de agua destilada, y se colocaron dentro del recipiente donde se llevó a cabo la hidrólisis. El pH fue ajustado a 8 con NaOH al 0.1 N. La reacción se inició con la adición de 1 ml del homogeneizado enzimático (con una actividad proteolítica de 6.0 u/mg). El pH se mantuvo en 8 y se midió la cantidad de NaOH 0.1 N utilizado para mantener dicho pH durante 90 min. a 28° C

El grado de hidrólisis de la proteína se determinó con la siguiente fórmula (Dimes y Haar, 1994)

$$GH\% = [(B \cdot N_b \cdot 1.5 / M \cdot (S\% / 100)) / 8] \cdot 100$$

Dónde: B=ml de NaOH 0.1 N utilizados para mantener el pH en 8, N_b =Normalidad del NaOH 1.5 factores de calibración a pH 8 y 28° C, M=gramos de la mezcla, S= concentración de proteína en la mezcla (%) y 8 es el contenido total de enlaces peptídicos (meq/g) para la proteína de tripsina o caseína (Adler-Nissen, 1986).

Como una modificación adicional, el grado de auto hidrólisis de las muestras se determinó mediante la incubación de las muestras en las mismas condiciones de prueba, sin la adición del homogeneizado enzimático. Lo que permitió estimar el grado de hidrólisis corregidos

por la adición del extracto:

$$\text{GH\%corr.} = \left[\frac{(B-B') \cdot N_b \cdot 1.5}{M \cdot (S\%/100)} \right] \cdot 100$$

Dónde B'=ml NaOH 0.1 N utilizados para mantener el pH en 8.0 durante 90 min. a 28 °C. La caseína se empleó como fuente proteica pura para dar un valor porcentual a las diferentes muestras, teniendo como valor absoluto la hidrólisis que presentó la caseína, debido a que contienen aproximadamente el 98% de proteína en su composición (Dimes *et al.*, 1994).

La concentración de proteínas totales fue determinada por el método Bradford, 1976 que consiste en colocar 10 µl de muestra diluida a 1/10 de homogeneizado enzimático en una micro placa a la cual se le coloca 200 µl de Bradford incubando 5 min. a temperatura ambiente, posteriormente se realiza la lectura con un espectrofotómetro a 595 nm.

4.3.-Formulación de Dietas

Las dietas usadas para este experimento tienen como base la dieta de referencia (Bureau *et al.*, 2002). Los diferentes ingredientes fueron probados en una proporción de 70% de dieta de referencia y 30% del ingrediente. Cabe señalar que se ajustaron los niveles de inclusión de las fuentes de proteína de la dieta de referencia (harina de pescado, pasta de soya y harina de trigo) para obtener dietas isoprotéicas e isoenergéticas (Tabla 1.1)

4.4.-Método de elaboración de las Dietas

Los ingredientes secos se tamizaron a menos de 250 µm mezclándolos por 20 min, 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 que se almacenaron a 4°C hasta ser empleados.

5.-Análisis estadísticos

Para determinar la diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el análisis de varianza de una vía y la prueba de rangos múltiples de Tukey para ponderar las diferencias entre los tratamientos, con una probabilidad de 0.05, en este experimento se analizaron 9 ingredientes y 6 dietas, el diseño fue un análisis completamente aleatorio con los tratamientos antes mencionados, para así evaluar el grado de hidrólisis de los 9 ingredientes y de las 6 dietas.

Tabla 1.1 Composición de las dietas para la evaluación de la digestibilidad *in vitro*. D1 (dieta con concentrado proteico de soya), D2 (dieta con gluten de trigo), D3 (dieta con concentrado proteico de papa), D4 (dieta con *Spirulina* yucateca), D5 (dieta con coctel vegetal) y D6 (dieta con harina de calamar)

INGREDIENTES	Soya	Trigo	Papa	<i>Spirulina</i>	Coctel Vegetal	Calamar
HARINA DE PESCADO	19	14	14	21	16	16
PASTA DE SOYA	15	15	15	18	15	15
HARINA DE TRIGO	8.5	11.5	13	10	10	14
HARINA DE CALAMAR CHILENA						30
CON. PROT. SOYA	30					
CON. PROT. DE PAPA			30			
GLUTEN DE TRIGO		30				
<i>SPIRULINA</i>				30		
COCTEL*					30	
ACEITE DE BACALAO	5	6	4.5	7	6	3.5
LECITINA DE SOYA	2	2	2	2	2	2
COLESTEROL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ALMIDÓN	15.5	16.5	16.5	7	15.5	14.5
ROBIMIX C	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029
VIT ROBIMIX	2	2	2	2	2	2
AGLUTINANTE	1	1	1	1	1	1
CEOLITA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TOTAL	100	100	100	100	100	100
	Soya	Trigo	Papa	<i>Spirulina</i>	Coctel Vegetal	Calamar
LÍPIDOS	9	9	9	10	8	9
CARBOHIDRATO	20	20	20	23,4	23,5	31
PROTEÍNA	40	40	40	43	42	40
ED kJ/g	15	15	15	18	15	17

*En la tabla 1.2 se presenta la composición de la dieta coctel la cual se incluyó al 30 % como los de más ingredientes.

La dieta coctel fue formulada considerando el mejor aporte de cada ingrediente, y así obtener un mejor rendimiento con dicha dieta. Tabla (1.2)

Tabla 1.2 Composición en porcentaje de inclusión para formar el coctel vegetal.

Ingrediente	% de inclusión
Papa	31.5
Soya	52.7
Trigo	10.5
<i>Spirulina</i>	5.3

6.- Resultados

6.1.- Digestibilidad *in vitro* de los ingredientes.

Los resultados del ANOVA del grado de hidrólisis (GH) de las diferentes ingredientes en juveniles de *L. vannamei* mostraron diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Tabla 1.3). El mejor insumo fue la pasta de soya con un rendimiento del (19.4 %) ($p < 0.05$), con valores intermedios se encuentran el CPSP (11.4 %) y la HP (14.7 %); Mientras que las fuentes de proteína de origen vegetal junto con la harina de calamar presentaron valores bajos, que van desde 4.3 hasta 10.3 (Tabla 1.3).

Para un análisis complementario se contempló el GH en % y con una relación directa al % de GH obtenido por la caseína, teniendo como referencia el GH como 100%, esta referencia se usó tanto para los ingredientes como para las dietas (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Grado de hidrólisis total (GH) y Porcentaje hidrólisis (%H) de los diferentes ingredientes.

Ingredientes	GH Total	%H
Pasta de soya	19.4± 3.8 ^a	60.9 ± 11.9
Harina de trigo	7.8± 1.3 ^b	24.6 ± 4.1
Gluten de trigo	4.3± 1.3 ^b	13.7 ± 4.1
Concentrado proteico de soya	8.8 ± 2.3 ^b	27.5 ± 7.2
Concentrado proteico de papa	5.8±0.7 ^b	18.2 ± 2.2
<i>Spirulina</i> (de Yucatán)	7.4±0.6 ^b	23.3 ± 1.9
<i>Spirulina</i> (comercial)	10.3±3.2 ^b	32.4 ± 10.1
Concentrado proteico de solubles de pescado	11.4±0.2 ^{ab}	35.6 ± 0.6
Harina de pescado	14.7± 7.6 ^{ab}	46.1 ± 23.8
Harina de calamar chilena	10.2±1.4 ^b	31.8 ± 4.4

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 3$

6.2.- Digestibilidad *in vitro* de las dietas.

En la Tabla 1.4 se presentan los resultados del grado de hidrólisis total y el % de hidrólisis de las dietas. El ANOVA mostró la existencia de diferencias significativas entre las dietas ($p < 0.05$). Los valores del grado de hidrólisis más elevados se obtuvieron con el coctel vegetal (D5) y la harina de calamar chilena (D6) ($p < 0.05$), mientras que los valores menores se obtuvieron en las dieta que contenía el concentrado proteico de papa (D3) y la *Spirulina* (D6).

Tabla 1.4.- Porcentaje de hidrólisis de las diferentes dietas. D1 (concentrado proteico de soya); D2 (gluten de trigo); D3 (concentrado proteico de papa); D4 (*Spirulina* yucateca); D5 (coctel vegetal); D6 (harina de calamar)

Dieta	Soya	Trigo	Papa	<i>Spirulina</i>	Coctel Vegetal	Calamar
GH Total	1.00±0.34 ^a	1.20±0.15 ^a	0.75±0.09 ^b	0.83±0.12 ^b	2.00±0.14 ^a	1.59±0.38 ^a
% hidrólisis	32.6 ± 11.1 ^{ab}	39.6 ± 5 ^{ab}	23.7 ± 2.8 ^b	26.9 ± 0.6 ^b	64.9 ± 3.2 ^a	51.3 ± 16 ^a

* Letras distintas indican diferencias significativas (p< 0.05), n = 3

7.-Discusión.

Los resultados alcanzados corroboran la hipótesis propuesta en la tesis, evidenciando la posibilidad de la sustitución parcial de los insumos de origen animal marino por los insumos de origen vegetales y en la interacción que tienen entre ellos en la dieta coctel.

La mayoría de los estudios aplicados a la digestibilidad *in vitro* mediante la utilización del pH-stat, están relacionados con el mejoramiento de las dietas alimenticias, y están siendo aplicados a especies acuáticas, por representar la forma más viable para generar conocimientos sobre los aspectos fisiológicos de los organismos.

La necesidad de conocer los aspectos fisiológicos de la actividad digestiva del camarón, son fundamentales para elegir los mejores ingredientes que pueden ser utilizados en la formulación de nuevas dietas alternativas.

Digestibilidad *in vitro* de los ingredientes.

Soya

La proteína de origen vegetal es nutricionalmente viable como recurso en la elaboración de nuevas dietas (Davis *et al.*, 2000). En el caso de los ingredientes, el elevado GH que presentó la pasta de soya se relaciona positivamente con lo reportado por Siccardi III *et al.*, (2006) quienes mencionan que la digestibilidad es mayor del 48% y Ezquerria *et al.*, (1997) donde este insumo fue significativamente más digerible que los de origen animal marino analizados, dándole un gran potencial para ser un sustituto viable de la harina de pescado (Lim *et al.*, 1998; Hardy, 1999), lo que es posible por sus niveles altos de proteína cruda (48%) (Smith *et al.*, 2005).

El procesamiento de la soya para producir harinas, concentrados y aislados mejora sus propiedades nutricionales. Existen varios métodos para mejorar su valor nutritivo, como ser sometida a tratamientos de calor por periodos de tiempo y condiciones de humedad específicas; Por ejemplo el descascarado aumenta el contenido proteico de la harina de soya de 44.8 % a 50 %, valores muy superiores al 31.2 % que poseen los granos de soya secados al vapor (NRC, 1993), el concentrado proteico de soya, por su parte alcanza un 62 % de dicho nutriente (Vielma *et al.*, 2000).

En el presente estudio, el GH del concentrado proteico de soya, tiene el mismo

comportamiento que lo reportado por Smith, (1985), donde no reporta diferencias en la digestibilidad de las proteínas de origen vegetal y animal suministradas al *L. vannamei*. Estos resultados se contraponen a los coeficientes de digestibilidad de proteína más bajos de harinas de origen vegetal, en comparación con harinas de pescado, harinas de origen animal marino, para *P serratu* (Fenucci *et al.*, 1982) e indican la naturaleza omnívora de *L. vannamei*.

El alto rendimiento de la pasta de soya y la falta de diferencia significativa con el concentrado proteico de soya ante las fuentes de origen animal marino, demuestra que esta fuente es un elemento importante para las dietas en camarón y con un alto potencial en la sustitución de la proteína de origen animal.

Trigo

El insumo trigo presentó valores sin diferencia estadística con los insumos de origen animal, esto se puede atribuir a que la fuente trigo contiene hasta 42.6% de proteína cruda (Bautista-Tereul *et al.*, 2003), además estos resultados concuerdan con Tacon *et al.*, (1989) quienes reportan su uso en la alimentación del camarón, con un nivel de inclusión del 25%, dando razón a ser una fuente potencial para el cambio de proteína de origen animal.

Los resultados están sujetos al hecho de que las fuentes de trigo tanto en harina como en gluten son afectadas por la precipitación, temperatura, textura y su misma composición. El contenido de proteína varía ampliamente según el trigo y la presentación (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000, a y b), es por esto la diferencia entre las dos presentaciones que se analizaron de esta fuente.

Hay que tener en cuenta los efectos de los inhibidores presentes en las harinas vegetales, sobre las proteasas digestivas, que pueden afectar la digestibilidad aparente *in vitro* de las fuentes, está es una posible causa de por la que los resultados mostraron valores por debajo de las fuentes de origen animal marino, pero sin diferencia significativa.

Además las diferencias en los valores de hidrólisis entre las distintas proteínas, podrían estar relacionadas a dos factores principales: 1) perfiles aminoácidos: donde las enzimas ácidas hidrolizan enlaces peptídicos en los que participan aminoácidos aromáticos y ácidos, así la proporción de estos en una proteína, pueden condicionar el grado de hidrólisis de la misma y 2) a las características de sus estructuras terciarias: la accesibilidad y flexibilidad

de su estructura tridimensional condiciona la susceptibilidad de los enlaces peptídicos para ser hidrolizados por las proteasas.

Por tanto, el uso de esta fuente presenta un gran potencial por el hecho de ser un recurso común en todo el planeta.

Papa

La papa (*Solanum* sp.) se ha utilizado en forma de concentrados proteicos para substituir harina de pescado en niveles que van de 0.4 y 0.6% de la proteína en alimentos para la trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*), presentando rendimientos bajos, pero esta fuente se usa en combinación con harina de hígado de calamar en insumos de camarón (Merican y Smith, 1995) y al igual que en el presente trabajo presenta baja digestibilidad (menos del 8%), pero se usa por el aporte que tiene de vitamina C, este insumo es de alto valor pues a nivel mundial está entre los 4 alimentos con mayor disponibilidad (trigo, arroz, maíz y papas).

La única posibilidad de utilizar este producto está relacionada a la disponibilidad de harina libre de factores anti-nutricionales (FAN), los cuales son eliminados por los procedimientos de calor, y usar concentrados proteicos para obtener un mejor rendimiento (Moyano *et al.*, 1992).

Spirulina

Las microalgas del Género *Spirulina* son, en general, fuente natural de gran valor proteico (55-70%), vitaminas, aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos y pigmentos antioxidantes, como los carotenoides (Belay *et al.*, 1996; Falquet, 1996). Poseen, además, un alto valor nutricional siendo efectivas para la protección de la radiación e inmunomoduladoras (Takeuchi *et al.*, 2002), es extremadamente rica en tiamina, niacina, piridoxina y cianocobalamina; contiene niveles importantes de pantotenato de calcio, ácido fólico, inositol, β -carotenos (provitamina A) y tocoferoles (E). (Mustafa *et al.*, 1994), es por estos valores el interés en usar esta fuente, la cual ha sido muy estudiada en diferentes etapas del cultivo de camarón siendo en la etapa de post larva donde destaca su gran eficiencia como suplemento alimenticio (Jaime, 2006), lo cual al ser en etapas tan tempranas del desarrollo del organismo sus características de capacidad digestiva y preferencias son muy diferentes a las que presenta en la etapa juvenil, donde esta fuente

alimenticia, no es una fuente funcional, debido al bajo rendimiento que se obtuvo de ella, esto puede también estar relacionado a que parte del contenido en nitrógeno proviene de los ácidos nucleicos, reduciendo el porcentaje real de proteína (Higuera y Cardenete, 1987), y que la composición de los lípidos de *Spirulina* sp. Varía dependiendo de la cepa de *Spirulina* y de las condiciones en que fueron cultivadas (Pascaud, 1993), es por esto la diferencia en GH entre las dos fuentes de *Spirulina*.

Harina de Pescado

La harina de pescado no presentó los valores de hidrólisis más altos dentro de todos los insumos, pero sí fue el más alto dentro de los insumos de origen animal marino, junto con el concentrado proteico de pescado; Esto puede ser indicativo de calidad de las harinas, el sistema enzimático del camarón es específico y los cambios que son ocasionados por el secado pueden afectar la estructura de las proteínas haciéndolas difíciles de digerir por las enzimas del camarón. Nieto (2003) indica que las harinas de pescado con alto contenido de cenizas, bajo contenido de proteína cruda y baja proteína soluble poseen un alto grado de autohidrólisis o baja estabilidad en agua destilada, debido probablemente a que son elaboradas con subproductos de pescado (vísceras, huesos, escamas y restos de músculo) y poseen una mayor concentración de enzimas propias del pez del cual se obtuvieron, por lo tanto, la proteína insoluble puede ser hidrolizada y causar cambios en el pH, de esta manera se puede sobreestimar la digestibilidad de la proteína en harinas con alto contenido de cenizas, lo cual representa una limitante para el método de digestibilidad *in vitro*. Los reportes que se encuentran de la digestibilidad de la harina de pescado van desde los 44% al 99 % y esta gran variabilidad se puede explicar por las características de la harina y su manejo (Nieto, 2003). De ahí que es conveniente conocer los valores de digestibilidad *in vivo* para la selección de los ingredientes a utilizar en los alimentos.

Harina de Calamar

En relación a la harina de calamar esta es una excelente fuente de proteína, que compite con la harina de pescado en sus aplicaciones para la fabricación de alimentos balanceados. Las vísceras de calamar han sido utilizadas para el consumo humano en Corea, mientras que el hígado se utiliza para la elaboración de aceite.

Desde el punto de vista de su utilización como ingrediente en acuicultura, la harina de

calamar es una excelente fuente de proteínas en dietas para camarones. Ha sido probada en numerosos peneidos: *L. setiferus*, *L. stylirostris* (Fenucci *et al.*, 1980), *L. vannamei* (Dokken y Lawrence, 1985). Alimentando *Marsupenaeus japonicus* con dietas que contienen harina de calamar se produce un efecto estimulador del crecimiento, con incremento de la ganancia de peso (Cruz-Suárez y Guillaume, 1987) y en *Penaeus monodon* se determinó que ejemplares alimentados con raciones suplementadas con un 10% de harina de calamar, tuvieron un mayor crecimiento y un factor de conversión del alimento mayor en jaulas externas que en tanques internos. (Cruz-Suárez *et al.*, 1992). El uso de harina de calamar gigante en alimentos para *L. vannamei* y *L. stylirostris* favoreció el crecimiento y la digestibilidad, dependiendo del tratamiento térmico y la concentración empleada de este ingrediente en la dieta (Cordoba-Murueta y García-Carreño, 2001 y 2002; Ezquerro *et al.*, 2003).

El calamar es un producto con alto nivel nutricional del que puede aprovecharse hasta un 75 % cuando es eviscerado. Es una excelente fuente de proteínas en dietas para camarones (Fenucci *et al.*, 1980; Dokken y Lawrence, 1985; Cruz-Suárez *et al.*, 1992), que posee las concentraciones adecuadas de todos los aminoácidos, excepto de fenilalanina, contiene vitaminas A, B, C y D, compuestos glicerosfórficos, cloruros, carbohidratos y proteínas en cantidades adecuadas y de fácil digestión. Sus componentes son digeribles casi en un 100%, en contraposición con el 63% de la harina de carne de res; Es por estas razones que se usó este insumo como control pues se trató de que las fuentes que se estudiaron cumplieran con los más altos rendimientos en la nutrición de *L. vannamei*.

Digestibilidad *in vitro* de las dietas

Los niveles de harina de soya en los alimentos comerciales para camarones por lo general se encuentran entre el 10 y el 25%; el nivel máximo no debe exceder el 40% (Akiyama *et al.*, 1989).

Tacon y Akiyama (1997) presentaron un compendio de los experimentos realizados con soya en diferentes sistemas de cultivo para la alimentación de camarones y el nivel de inclusión utilizado. Martínez Palacios *et al.*, (1996) también informaron resultados de experimentos en los que se utilizó la soya procesada de formas diferentes como sustituto de harina de pescado y harina de calamar. Existen diferencias entre especies y tallas en la

habilidad de los animales para utilizar los productos de la soya como sustitutos de la harina de pescado.

En el caso de *L. vannamei* presentó una GH de la D1(soya) comparable con la dieta D6 (calamar), la cual ha sido acorde, al alto rendimiento de dicha fuente obtenida en este estudio, lo que se le atribuye a la eficiencia de las enzimas presentes en el hepatopáncreas de *L. vannamei*.

Los resultados muestran que las proteínas de soya tienen mayor solubilidad en el rango de pH estudiado, presentan un máximo en su solubilidad a pH 8 y su menor solubilidad a pH 5, lo que concuerda con el rango de pH del punto isoelectrico (PI) de sus proteínas (pH 4,8–5,6), es por esto que los resultados fueron tan positivos tanto en la evaluación como ingrediente y como parte de una dieta.

Además Paine (2002) señaló a la soya como una excelente fuente de proteínas de alta digestibilidad, considerándola como la proteína vegetal más nutritiva, lo que la convierte en un complemento idóneo en dietas vegetarianas y de calidad comparable a las proteínas de origen animal

En el caso de la D2 (gluten de trigo) la mayor parte del fósforo se encuentra en forma de fitatos lo cual disminuye su bio-disponibilidad (García-Galano *et al.*, 2007); pero parece fácil de hidrolizar por la actividad enzimática de *L. vannamei*, por lo que no presentó diferencias significativas con la D6 (calamar), quedando como una de las mejores opciones pues presenta una tendencia positiva en su GH, lo cual la coloca con alto potencial para la sustitución de fuentes de proteína de origen animal.

Para el uso de este ingrediente solo hay que tener muy presente el proceso de extrusión el cual incrementa las disponibilidad y los coeficientes de digestibilidad (Davis *et al.*, 2002).

Con respecto de la dieta D3 (papa con 23.7%), su bajo GH coincide con el bajo GH que el propio ingrediente tuvo (18.2%). Se han utilizado concentrados proteicos de papa para substituir harina de pescado en niveles que van de 0.4 y 0.6% de la proteína en alimentos para la trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*). Los resultados no fueron adecuados debido a la presencia de solanina. Así estudio confirma su relativa baja digestibilidad para el camarón. La única posibilidad de utilizar este producto está relacionada a la disponibilidad de harina libre de éste FAN (Moyano *et al.*, 1992).

La D4 (*Spirulina yucateca*) presentó una diferencia significativa con respecto a la D6

(calamar) lo cual pudo deberse a la gran cantidad de pigmentos (clorofila a, carotenoides y xantofilas, ficobiliproteínas, c- ficocianina y aloficocianina), que es extremadamente rica en tiamina, niacina, piridoxina y cianocobalamina; contiene niveles importantes de pantotenato de calcio, ácido fólico, inositol, β -carotenos (provitamina A) y tocoferoles (E), (García *et al.*, 2007) los cuales pueden afectar el GH de este insumo, dando valores por arriba de lo obtenido con las dietas de origen animal marino.

Por último tenemos que la dieta denominada D5 (coctel vegetal) la cual presentó el GH más elevado, solo comparable con la D6 (calamar), esto se atribuye a que la D5 es la combinación de los diferentes ingredientes de origen vegetal antes mencionados como es el concentrado proteico de soya, el gluten de trigo la *Spirulina* y el concentrado proteico de papa, los cuales presentan unas limitantes como productos únicos, pero al combinarlos pueden potencializar su rendimiento y así complementarse unos con otros, usando las gramíneas, las cuales son las más importantes, después las leguminosas que son consideradas los suplementos naturales de los cereales (Nowacki, 1980), ya que sus niveles generalmente altos de lisina compensan su deficiencia en las gramíneas, mientras que éstas subsanan la insuficiencia de aminoácidos sulfurados de las leguminosas (Van der Poel, 1990).

La calidad nutricional de dicha dieta varía debido a la presencia de FAN los cuales pueden ser eliminados por medio de un procesamiento de calor (Liener, 1980).

Este efecto es muy notable, ya que cuando se evaluaron los ingredientes de forma independiente, los valores de digestibilidad fueron bajos en general tanto para las fuentes de proteína vegetal, al igual que la harina de calamar chilena, pero al incluir los ingredientes en la dieta referencia mejoró significativamente el GH, este efecto de incrementar su GH tanto para los ingredientes de origen animal como de origen vegetal puede deberse a que la dieta de referencia contiene CPSP, que es un ingrediente pre-hidrolizado, es pobre en cenizas y rico en proteínas. No contiene proteínas en el sentido propio del término, sino básicamente péptidos y aminoácidos, que le confieren una solubilidad casi total (Guillaume *et al.*, 2001) al tener un gran número de sitios aminos y carboxilos terminales libres para la acción de las peptidasas, lo que le confiere una velocidad de hidrólisis elevada.

Y son estos resultados los cuales sugieren que el suministro de proteína de origen vegetal combinados producen mejores resultados, que cuando la alimentación se basa en una sola

fFuente proteica (Lovett, 1998); Esta informaci3n permite dar paso a una dieta vegetal mejorada para as3 buscar la aplicaci3n de dicha dieta en todo un ciclo de cultivo.

8.- Conclusiones

Despu3s de analizar las fuentes de prote3nas alternativas de origen vegetales en el presente trabajo de investigaci3n como sustituto de fuentes de prote3na de origen animal marino en dietas para *L. vannamei* se puede concluir:

Que las leguminosas y los cereales que se usaron tienen un gran potencial para su uso en acuicultura como sustituto total o parcial de fuentes de prote3na de origen animal marino, por los altos niveles de prote3na que contienen.

Se ha probado que las leguminosas son veh3culos adecuados en sistemas de extrusi3n en donde se mezclan con subproductos de origen animal, obteniendo mezclas proteicas de alta calidad (Galindo *et al.*, 2000).

La integraci3n de varias fuentes de prote3nas de origen vegetal potencializan la digestibilidad *in vitro*, presentando una tendencia positiva sobre las fuentes convencionales como son la harina de pescado, concentrado proteico de pescado y el calamar en la elaboraci3n de las dietas para camar3n.

La digestibilidad para las fuentes utilizadas en el estudio concuerda con lo reportado por diferentes autores, ya que varios ingredientes presentaron un GH. que no tiene diferencias significativas con el elemento que se busca sustituir.

El GH es un buen indicador de la digestibilidad de un insumo o una dieta, pero se necesita correlacionar con la digestibilidad *in vivo* para una mejor observaci3n de la respuesta y asimilaci3n del elemento en estudio.

Hay que recordar que estas fuentes tienen varios FAN y por tal motivo existen restricciones en su utilizaci3n. Se considera necesario continuar con esfuerzos de investigaci3n para identificar especies o variedades con bajos valores de FAN.

Es importante tambi3n realizar estudios sobre t3cnicas efectivas y de bajo costo, para la eliminaci3n de ciertos FAN y estudios agron3micos para incrementar la producci3n de las plantas seleccionadas, con el fin de conocer el potencial de las mismas a nivel comercial.

Capítulo 2

Evaluación de dietas con proteína de origen vegetal y una proteína animal marina en juveniles de *L. vannamei*.

1.- Introducción

En la acuicultura se han desarrollado métodos de digestibilidad *in vitro* de proteína para lograr un entendimiento sobre la posibilidad de utilizar nuevas fuentes de proteína en la alimentación de camarones (Marleta *et al.*, 1992; Forrellat, 1998), sin embargo, estos métodos son más utilizados como herramientas para darnos un acercamiento de la digestibilidad que presentan las posibles fuentes de proteína, estas herramientas se complementan de manera muy eficiente con el estudio de la digestibilidad *in vivo* de los alimentos y de los nutrientes utilizados para así poder hacer nuevas formulaciones de dietas alternativas (Nolasco *et al.*, 2006).

Tanto en las dietas tradicionales como en las dietas alternativas la proteína es el ingrediente más abundante (Smith *et al.*, 1992; Lemos *et al.*, 2000), la cual representa del 45% al 60% de los costos de producción en el cultivo de camarón, y puede influir en la habilidad de un organismo para digerir el alimento, mediante la regulación de la síntesis, secreción e inactivación de sus enzimas digestivas (Snook y Meyer, 1964).

En el estudio de la nutrición del camarón es necesario que las fuentes de proteína presenten valores altos de digestibilidad (Akiyama *et al.*, 1992; Sarac *et al.*, 1994; Sudaryono *et al.*, 1995), ya que una dieta puede parecer una excelente fuente de nutrientes debido a su composición química, pero su valor nutritivo estará en función de la asimilación de los nutrientes para ser digeridos y absorbidos por el animal (Akiyama *et al.*, 1991; Sudaryono *et al.*, 1996).

Se ha planteado la necesidad de buscar nuevas fuentes proteicas de origen vegetal, con el contenido de nutrientes esenciales y la digestibilidad apropiada, para así incorporar estos nutrientes en la alimentación de distintas especies de camarones en cultivo (Hardy y Masumoto, 1991; Chamberlain *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta la fecha, la mayor atención se ha enfocado en la harina de soya (Tidwell *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 2004; Williams, 2004) harina de trigo (Borlongan *et al.*, 2003) y harina de canola (Bell, 1993; Thiessen, 2004), como substitutos de la proteína de origen animal marino (Lovett, 1991; Akiyama *et*

al., 1991).

El estudio de la digestibilidad aparente, la fisiología, la bioquímica y la calidad del músculo en *L. vannamei*, es fundamental para poder entender cómo es que el camarón responde a nuevas fuentes proteicas, y para lograr esta meta se diseñaron 2 experimentos, en los cuales se integraron el estudio de la digestibilidad *in vivo* de diferentes fuentes alternativas de proteína de origen vegetal. Este trabajo se enfoca en las fuentes tradicionales, con la modificación de no usar las harinas, si no los concentrados proteicos y otras fuentes alternativas no convencionales.

Además de estudiar cómo es que esta proteína alternativa afecta los aspectos a nivel de organismo (distribución de energía y crecimiento), aspectos de adaptación bioquímica, a través de la evaluación de las enzimas digestivas como son la tripsina y quimotripsina, se valorara la calidad del producto final por medio de la textura de la carne de los juveniles de *L. vannamei*.

En un primer experimento se probaron las dietas con el concentrado proteico de soya, el gluten de trigo y el concentrado proteico de papa.

En un segundo experimento se probaron 3 dietas una de ellas con *Spirulina*, otra compuesta por un coctel vegetal (mezcla del concentrado proteico de soya, el gluten de trigo, el concentrado proteico de papa y la *Spirulina*) y la dieta que contenía harina de calamar, usada como control.

Estas dietas fueron formuladas tomando en cuenta que los juveniles de *L. vannamei* presentan hábitos omnívoros oportunistas con tendencia a la herbivoría, y es esta característica de *L. vannamei* la cual permitió comparar la respuesta de estos organismos a tratamientos compuestos por dietas con fuentes proteicas de origen vegetal VS una dieta con la proteína de origen animal marino.

Estos ensayos nos permitieron hacer una correlación positiva entre los valores de digestibilidad aparente de las dietas y la respuesta de los organismos ante cada una de los tratamientos por medio de la actividad de las principales enzimas digestivas, otro valor que nos permitió ver la respuesta de los organismos ante los tratamientos, es el crecimiento (visto a través de la ganancia en peso) como resultado de una buena distribución de la energía.

2.- Hipótesis

Los organismos en estadio juvenil de *L. vannamei* presentarán la misma capacidad de digestibilidad ante dietas con proteína de origen vegetal que una dieta con proteína de origen animal marino, lo cual se verá reflejado en la tasa de crecimiento, supervivencia actividad enzimática (tripsina y quimotripsina) y textura del producto final.

3.- Objetivo general

Determinar el efecto de dietas con fuentes de proteína de origen vegetal y animal marino, sobre la digestibilidad *in vivo* y su correlación con la actividad de la tripsina y la quimotripsina, así como la distribución de energía, el crecimiento, supervivencia y calidad músculo (textura) de los juveniles de *L. vannamei*.

3.1.- Objetivos particulares del Experimento I.

Evaluar el efecto de las dietas D1 elaborado con concentrado proteico de soya, D2 elaborada con gluten de trigo y D3 dieta elaborada con concentrado proteico de papa, en juveniles de *L. vannamei*, en aspectos como: digestibilidad *in vivo*, actividad enzimática de la tripsina y la quimotripsina del hepatopáncreas. Además del crecimiento como producto de la distribución de energía, supervivencia y calidad del músculo (textura).

3.2.- Objetivos particulares del Experimento II.

Evaluar el efecto de la dieta D4 elaborada con *Spirulina*, la dieta D5 coctel elaborada con las fuentes proteicas de origen vegetal (soya, trigo, papa y *Spirulina*), y por último la dieta D6 formulada con harinas de origen animal marino como es el calamar, en la digestibilidad *in vivo* y su correlación con la actividad de la tripsina y la quimotripsina del hepatopáncreas de los juveniles de *L. vannamei*. Además del crecimiento como producto de la distribución de energía, supervivencia y calidad del músculo (textura).

4.- Materiales y Métodos

4.1.- Diseño experimental

Para cumplir con el objetivo señalado se diseñaron dos experimentos en diferentes tiempos, ya que por cuestiones de disponibilidad de infraestructura era imposible realizar el análisis de los 6 tratamientos al mismo tiempo, para ambos bio-ensayos los organismos se

obtuvieron de los estanques exteriores de la UMDI Sisal, provenientes de un desove múltiple, los cuales fueron alimentados con una dieta comercial al 30% de proteína de origen animal marino, las condiciones de siembra fueron: temperatura de 28 ± 1 °C con una salinidad de 35 ± 0.5 ‰ y un oxígeno de 6.5 ± 1 mg O₂/ml.

El diseño para el experimento I y II fue completamente aleatorio con 3 tratamientos y 3 réplicas. La composición de las dietas se basó en la usada por Bureau *et al.*, (2002) donde se incluyó el ingrediente de estudio al 30%. Para el experimento I, los tratamientos fueron D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa). La densidad de siembra fue de 50 organismos/tanque con un peso promedio de 6 ± 0.5 g. La duración del experimento fue de 42 días, usando como marcador para la digestibilidad *in vivo* la zeolita (Suárez *et al.*, 2008).

Mientras que para el experimento II los tratamientos a probar fueron D4 (*Spirulina*), D5 (coctel) y D6 (calamar), con una densidad de siembra por estanque de 30 organismos con un peso promedio de 12 ± 1.2 g. La duración del experimento fue de 35 días, usando como marcador para la digestibilidad *in vivo* la zeolita (Suárez, 2008; Suárez *et al.*, 2009).

4.2.- Composición de las dietas

En la Tabla 2.1 se presenta la composición de las dietas empleadas en ambos experimentos, la composición de la dieta nos da un balance isocalórico e isoproteico.

La fórmula de la dieta coctel está en base a los resultados obtenidos en el experimento del capítulo 1 y con el experimento I de este capítulo, su formulación se basó en la digestibilidad que presentan las diferentes fuentes de proteína vegetal probadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabla 2.2 Composición en porcentaje de inclusión para el coctel vegetal.

<u>Ingrediente</u>	<u>% de inclusión</u>
Papa	31.5
Soya	52.7
Trigo	10.5
<u><i>Spirulina</i></u>	<u>5.3</u>

La tabla 2.3 presenta el cómputo químico obtenido a partir de los aminogramas realizados para los 2 experimentos teniendo diferentes aminoácidos limitantes dependiendo de las dietas.

Tabla 2.1. Composición de las dietas de los Experimentos I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa) Experimento II. Tratamientos D4 (*Spirulina*), D5 (coctel) y D6 (calamar).

INGREDIENTES	Experimento I			Experimento II		
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
HARINA DE PESCADO	19	14	14	21	16	16
PASTA DE SOYA	15	15	15	18	15	15
HARINA DE TRIGO	8.5	11.5	13	10	10	14
CALAMAR						30
CON. PROT. SOYA	30					
CON. PROT. DE PAPA			30			
GLUTEN DE TRIGO		30				
<i>SPIRULINA</i>				30		
COCTEL					30	
ACEITE DE BACALAO	5	6	4.5	7	6	3.5
LECITINA DE SOYA	2	2	2	2	2	2
COLESTEROL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ALMIDÓN	15.5	16.5	16.5	7	15.5	14.5
ROBIMIX C	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
VIT ROBIMIX	2	2	2	2	2	2
AGLUTINANTO	1	1	1	1	1	1
CEOLITA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TOTAL	100	100	100	100	100	100

*La formulación de dieta coctel se muestra en la tabla 2.2

Tabla 2.3 Cómputo químico de las dietas los Experimentos I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa) Experimento II. Tratamientos D4 (*Spirulina*), D5 (coctel) y D6 (calamar).

a.a.	Experimento I			Experimento II		
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Arg	98	55	72*	95	100	100
His	97	75	85	100	100	93
Lis	94	47*	100	60*	72*	100
Leu	97	89	100	100	96	100
Ile	100	79	100	100	100	100
Val	91	76	100	100	100	91*
Thr	81*	60	100	81	82	93
Met	83	73	115	93	100	100
PHE	100	100	100	100	100	100
Trp	95	81	100	100	100	100

*primer a.a. limitante

En el caso de la D1 la Treonina es al a.a. limitante mientras que para la dieta 2, 4 y 5 el a.a. limitante es la lisina, mientras que la D3 presenta como a.a. limitante a la Arginina, y por último tenemos que la D6 tiene como a.a. limitante a la Valina la cual está muy cerca de no serlo.

4.3.- Método de elaboración de las dietas experimentales

Los ingredientes secos se tamizaron a menos de 250 μ m mezclándose durante 20 min, posteriormente se adicionaron los aceites, continuando el mezclado hasta formar la pasta, la cual se pasó por un molino de rodillo sin fin para extruirla y formar los pellets, los cuales fueron secado a 45°C y posteriormente almacenados a 4 °C hasta ser empleados.

4.4.- Descripción del dispositivo y condiciones de manejo de ambos experimentos

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 U.V. y un cartucho de 50 μ ; Además de lo anterior se contó con un sistema de recirculación el cual tuvo un filtro de arena de lecho profundo, filtro de cartucho 20 μ , un desproteínizador, además de contar con un “Chiller” (controlador de temperatura) que mantuvo una temperatura constante de 28 \pm 1 °C.

El dispositivo con el que se contó fue de 9 tanques de 1 m de área de base, con un volumen de 400 L los cuales siempre se mantuvieron con una salinidad de 36 partes por mil, una temperatura de 28 \pm 1°C y oxigenación a saturación; para mantener esta calidad de agua se hacía recambio del 30% del agua a diario y se usó un foto-periodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

La recolección de las heces se realizó 4 veces por día (9:30, 11:30 17:00 y 19:30 hr.), estas se recolectaban a la hora de haber alimentado a los organismos para evitar la pérdida por lixiviación o para que fueran tomadas como alimento por los mismos camarones (nota: siempre se limpiaban todas las tinas en la mañana para asegurarse que las heces recolectadas fueran de no más de una hora de haber surgido), todas las muestras se juntaron y se pusieron a secar a 60°C en la noche después de haber sido lavadas con agua destilada 3 veces.

4.5.- Ración alimenticia para ambos experimentos

La ración alimenticia se calculó cada 15 días, tomando el peso de 15 organismos por tratamiento y así hacer un promedio para ajustar la ración al 10% de la biomasa por estanque.

4.6.- Parámetros evaluados en ambos experimentos

4.6.1.- Análisis de la digestibilidad *in vivo* (%AIA)

El método de digestibilidad *in vivo* se realizó, usando como marcador la zeolita (Suárez, 2008; Suárez *et al.*, 2009), y se define como un método de análisis de las cenizas libres de carbono, ya que la zeolita proviene de la tierra de diatomeas, las cuales presentan al silíceo (Si) como componente de las tecas. Este método combina el lavado con ácido y la incineración de las muestras (para lo cual se utilizaron crisoles y una mufla para poder llevar a 500 °C la temperatura y garantizar la completa incineración de las muestras), tanto del alimento al cual se le incluyó una cantidad conocida del marcador, como de las heces fecales, de las cuales también se obtiene el marcador incluido en las dietas.

4.6.2.- Indicadores fisiológicos

Parámetros del balance Bioenergético

El consumo de oxígeno se determinó al finalizar los experimentos empleando organismos provenientes de cada uno de los tratamientos, para lo cual se usó un respirómetro de sistema abierto, utilizando 10 cámaras con capacidad de 500 ml o 1000 ml según sea el peso del organismo, en 9 cámaras se colocó 1 camarón, y se mantuvo una cámara control. Las determinaciones se realizaron por medio de las diferencias en las concentraciones de oxígeno en el agua de entrada y salida de las cámaras, conociendo la velocidad (constante promedio de 10 ml por 10 s) y temperatura (28±1 °C) (Rosas *et al.*, 2003).

$$VO_2 = \{([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}}) * F\} - \{([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}})_{\text{control}} * F_{\text{control}}\}$$

Dónde VO_2 es el consumo de oxígeno expresado en mg de O_2 por hora por animal, $[O_2]_{\text{entrada}}$ es la concentración en mg L^{-1} de O_2 en el agua que entra a la cámara respirométrica, $[O_2]_{\text{salida}}$ es la concentración en mg L^{-1} de O_2 en el agua que sale de la cámara respirométrica, F es la velocidad o flujo del agua que pasa a través de la cámara respirométrica expresada en litros por hora.

Los valores de (UE+ZE) fueron estimados basados en la ecuación de Cho y Bureau (1998), que corresponde al 0.9% de la sumatoria de la energía retenida en carcasa (RE)+incremento calórico(HiE)+energía basal (HeE).

$$UE+ZE=(RE + HeE + HiE)*0.09.$$

Parámetros bioquímicos

Para la medición de la actividad de las enzimas digestivas, se obtuvieron los hepatopáncreas de los juveniles provenientes de los tratamientos, los cuales fueron pesados, para obtener el peso húmedo promedio y se almacenaron en microtubos Eppendorf posteriormente sumergidos en nitrógeno líquido (-195°C) y almacenados a -40°C hasta el momento de su análisis.

Para preparar los extractos del hepatopáncreas, se les adicionó a cada microtubo 500 µl de agua destilada y se homogeneizaron las muestras sobre hielo por 30 segundos con un “rotor” a velocidad máxima. Seguidamente se centrifugaron 20 min a 14 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante (extracto crudo) se separó por decantación el cuál fue en parte utilizado para medir la actividad enzimática de la tripsina y quimotripsina.

Las determinaciones de la actividad de la tripsina y quimotripsina presente en los hepatopáncreas se realizó por los métodos de Geiger y Fritz (1988) y Geiger (1988), respectivamente.

La actividad de la tripsina se determinó usando BAPNA (benzoil-arginina-paranitroanilide) (Sigma B7632) 100 mM 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 Spectronic modelo 21D a 405 nm durante dos min, obteniéndose la diferencia en absorbancia entre el primer y segundo minuto utilizándose un coeficiente de extinción $\epsilon_{405}=1.02 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Geiger, 1988). Una unidad fue definida como la actividad correspondiente a 1 mM de p-nitroaniline liberado en un minuto. La actividad de la quimotripsina fue medida por el mismo método pero con el sustrato succinil-alalina-2-prolina-phenil-p-nitro-anilida (SAPPNA).

El procesamiento de las muestras fue a baja temperatura para evitar la desnaturalización de las enzimas; los extractos crudos y diluidos fueron utilizados inmediatamente para su análisis.

Para la determinación de la proteína soluble (Bradford, 1976) se utilizó un kit Bio-Rad-500-0006, la concentración de proteína soluble se cuantificó a través de la acción de una solución ácida de color (azul de Coomassie), el cual se liga a los aminoácidos primariamente básicos y aromáticos, especialmente la arginina. Para dicho análisis se colocaron 10 µl del extracto crudo en un pozo de las microplacas por triplicado para cada muestra y

posteriormente se añadieron 200 ml de la solución reactiva del kit, se dejó incubar 5 min, leyendo a 595 nm en un lector de la marca Biorad.

Electroforesis de la tripsina y quimotripsina

El análisis electroforético de los extractos proteínicos obtenidos de los músculos de organismos en diferentes estadios de muda, se llevó a cabo bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Laemmli (1970). Se trabajó con geles al 12 %. Las muestras fueron mezcladas con azul de bromofenol (0.01%); Se tomaron alícuotas de 10 µl y fueron colocadas en el borde superior del gel. La electroforesis fue llevada a cabo con un voltaje constante (100 volts) hasta que la banda de colorante (azul de bromofenol) llegó a 1.0 cm del borde inferior del gel. La actividad de las proteínas fue obtenida por medio de la incubación del gel en caseína al 1% y después teñido con azul de Coomassie al 0.1% (en 40% de metanol/10% ácido acético) durante una hora, destiñendo con una solución 40% de metanol y 10% de ácido acético. Se utilizaron marcadores pesos moleculares de amplio rango.

Supervivencia

La supervivencia se calculó en base al número de organismos que llegaron al final del experimento en relación con el número inicial de organismos. Los resultados se expresan en porcentaje.

Coefficiente Diario de Crecimiento

El crecimiento se determinó por medio del Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC) diario% mg día⁻¹.

$$CDC=(\text{Peso final}^{1/3}-\text{Peso inicial}^{1/3}/\text{días})*100$$

4.6.4. Análisis de calidad del producto

Textura

La textura fue evaluada en un texturómetro universal (modelo Xhatillon) y fue medida con el análisis de perfil de textura. La muestra usada para esta prueba fue el segundo y cuarto segmento del camarón. La muestra fue comprimida en un 75 % de altura original, para poder medir la resistencia al penetración y la mayor fuerza que se registró para la penetración de punzón (0.05 mm) se tomó como dureza.

Colágeno

Para la evaluación de la actividad de la enzima colagenasa se utilizó como substrato colágeno de tipo I de tendón de bovino, 6 mg de éste fue suspendido en 1.25 ml de buffer TES 0.1 M ph 7.5, contenido 0.35 Mm de CaCl₂. La reacción se inició adicionando 25 µl del extracto enzimático el cual se incubó por cinco horas a 37 °C.

Posteriormente la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó en una centrifuga Eppendorf a 14,000 r.p.m durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a tubos de ensayo 13X100 los cuales contenían 0.5 ml de ninhidrina al 1.5 %. La mezcla se incubó a 100 °C por 15 min, se enfrió a temperatura ambiente y se adiciono 2.5 ml de etanol al 50 %. Se corrieron blancos a la vez que incubo la muestra y se adicionó 2.5 ml de extracto crudo por 5 horas a 37 °C, posteriormente se leyó en un espectrofotómetro a 600 nm, la actividad colagenalítica se reportó en micromoles de leucina en 5 horas (Kim, 1991).

La metodología empleada para el aislamiento y caracterización parcial de colágeno a partir del músculo del camarón, permitió obtener distintas fracciones. De la proteína total presente en el músculo del camarón, la urea en alta concentración (6 M) permitió obtener un rendimiento total del 15±5%, que corresponde únicamente a la fracción de tejido conectivo.

5.- Análisis estadísticos

La prueba para analizar los resultados en este capítulo en ambos experimentos fue una ANOVA (Zar, 1999), realizando pruebas posteriori de Tukey. En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una probabilidad de 0.05, las variables analizadas para el primer experimento fueron las tres dietas con una inclusión al 30% de proteína de origen vegetal (D1, D2 y D3) y para el experimento II fueron las dietas restantes (D4, D5 y D6).

Las respuesta a evaluar para ambos experimentos fueron: Poblacional: supervivencia. Nutricional: crecimiento y digestibilidad aparente, Bioquímicas: (hepatopáncreas) proteína soluble, Actividad enzimática: Proteína total Tripsina y Quimotripsina y Calidad: textura del músculo del camarón.

6.- Resultados

6.1.- Experimento I

6.1.1.- Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA)

Los valores de digestibilidad aparente de proteína, energía y materia seca, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, como se puede observar en la Tabla 2.4 ($p > 0.05$).

Tabla 2.4. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de proteína, energía y de materia seca del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Tratamiento	CDA proteína	CDA energía	CDA materia seca
D1	68.5±2.5 ^a	67.5±2.6 ^a	70±2.4 ^a
D2	63.4±12.1 ^a	71.1±9.6 ^a	68.3±10.5 ^a
D3	74.1±1.9 ^a	75.1±1.9 ^a	68.3±2.4 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

La variabilidad presentada por los organismos alimentados con el tratamiento D2 (trigo) en los tres rubros de la digestibilidad es alta en comparación de los otros dos tratamientos.

6.1.2.- Indicadores fisiológicos

Balance energético

Los resultados del modelo de balance bioenergético se presentan en la Tabla 2.5. Para analizar estos resultados se realizó la prueba de ANOVA de una vía, para evaluar las diferencias entre de los tratamientos (D1, D2 y D3) y los parámetros del modelo.

En relación con la respiración de rutina (HeE) no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Para el incremento de calor aparente (HiE), el valor significativamente menor se observó en los juveniles alimentados con el tratamiento D1 (64.9±9.6 joules/animal/día), representando el 3.2% de la ED, mientras que los organismos provenientes del tratamiento alimentado con D2 (993.7±105.4 joules/animal/día) presentaron un gasto porcentual del 30%, mientras que el HiE de los organismos alimentados con el tratamiento D3 (702.8±45.6 joules/animal/día), presentaron un gasto del 39% de la ED.

El resultado para el parámetro de retención de energía (RE), fue que los organismos del tratamiento D1 presentaron una diferencia significativa (732.0±58.5 joules/animal/día)

siendo el de mayor valor, en el caso de los organismo del tratamiento D2 (554.2 ± 101.5 joules/animal/día) presentaron diferencias teniendo un valor intermedio ($p < 0.05$), y el tratamiento D3 (455.1 ± 57.3 joules/animal/día), resultó con el menor valor ($p < 0.05$).

Aunque analizando el porcentaje usado para RE se observó que el tratamiento D2 sólo dedicó el 16%, mientras que el tratamiento D1 alcanzó un 26% y el tratamiento D3 el 22% del total de la ED.

Tabla 2.5. Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Tratamiento	Valor ED	HeE	HiE	UE+ZE	RE	EEXV
D1	2212.4 ± 135.2^a	1238.1 ± 134.9^a	64.9 ± 9.6^a	148.6 ± 10.1^a	732.0 ± 58.5^a	28.82 ± 3.2^a
D2	3276.3 ± 33.0^b	1455.2 ± 135.9^a	993.7 ± 105.4^b	243.2 ± 2.5^b	554.2 ± 101.5^b	30.0 ± 5.5^a
D3	2255.5 ± 458.5^a	720.7 ± 378.6^a	702.8 ± 45.6^c	152.2 ± 34.4^a	455.1 ± 57.3^c	24.7 ± 3.1^a

ED (energía digerible calculada); HeE (energía de la respiración de rutina en ayuno; HiE (energía del incremento de calor aparente); UE (excreción amoniacal de ayuno); ZE (energía de excreción amoniacal post-alimentaria); RE (retención de energía para el crecimiento) EEXV (energía estimada para la muda).

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar, con una n de 3.

Para una mejor visualización de los resultados se muestran los resultados del balance bioenergético en forma de porcentaje (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Modelo del balance bioenergético en porcentaje de energía digerible calculada para del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Tratamiento	ED	HeE	HiE	(UE+ZE)	RE	EEXV
D1	100 ± 6.7^a	61.5 ± 6.7^a	3.2 ± 0.5^a	7.4 ± 0.5^a	26.4 ± 2.9^a	1.4 ± 0.2^a
D2	100 ± 1.0^b	44.4 ± 4.1^a	30.3 ± 3.2^b	7.4 ± 0.1^b	16.9 ± 3.1^b	0.9 ± 0.2^a
D3	100 ± 20.3^a	32.0 ± 16.8^a	31.2 ± 2.0^c	6.7 ± 1.5^a	20.2 ± 2.5^c	1.1 ± 0.1^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar, con una n de 3.

Parámetros bioquímicos

La proteína soluble y la actividad específica de la tripsina y la quimotripsina de los hepatopáncreas de los juveniles de *L. vannamei*.

En la Tabla 2.7 se presentan los resultados de proteína soluble y de la actividad específica de la tripsina y la quimotripsina de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento I.

La proteína total soluble, resultó afectada por los tratamiento dietéticos, de tal manera que los juveniles alimentados con el tratamiento D1, presentaron el valor significativamente mayor ($p > 0.05$), mientras que los provenientes de los tratamientos D2 y D3 resultaron menores ($p < 0.05$), sin diferencias entre ellos. Sin embargo, en lo que respecta a la actividad específica de la tripsina, el valor más elevado se presentó en los camarones alimentados con

el tratamiento D2 ($p < 0.05$), y los organismos sometidos al tratamientos D1 y D3 fueron los más bajos y sin diferencia entre ellos. Por último, la actividad de la quimotripsina no resultó afectada por los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 2.7 Proteína soluble (mg/ml) y actividad específica (mU/mg de proteína) de la tripsina y la quimotripsina del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Tratamiento	Proteína total soluble	Tripsina	Quimotripsina
D1	3.3±1.1 ^a	7.8±2.5 ^b	30.8 ± 7.6 ^a
D2	1.9±0.6 ^b	16.5±3.7 ^a	25.2 ± 7.3 ^a
D3	2.1±0.6 ^b	10.1±5.4 ^b	31.3 ± 4.7 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom.±Error estándar.

La actividad y desviación estándar más alta se encontró en la actividad enzimática de la quimotripsina en los tres tratamientos, lo cual muestra su variabilidad ante las tres fuentes de proteína de origen vegetal.

Electroforesis de la tripsina y quimotripsina

Para determinar si las dietas pueden provocar cambios en la expresión fenotípica de la tripsina y la quimotripsina se realizaron las electroforesis, tomando en cuenta también los estadios del ciclo de la muda. Para este experimento no se observaron diferencias en el patrón de bandas en ninguno de los tratamientos con fuentes de proteína de origen vegetal, ni de la tripsina, ni de la quimotripsina, las cuales presentaron 2 de las isoformas reportadas. (Fig. 2.3)

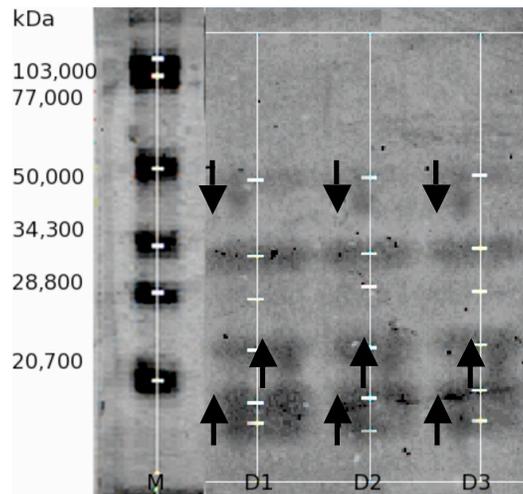


Figura 2.3. SDS PAGE gel realizado con pools de hepatopáncreas de *L. vannamei*: M: marcador de peso molecular, Línea 1: banda de camarones alimentados con el tratamiento D1 (soya), Línea 2: banda de camarones alimentados con el tratamiento D2 (trigo) y Línea 3: banda de camarones alimentados con el tratamiento D3 (papa). Las flechas señalan hacia arriba muestran la actividad de la tripsina, hacia abajo la actividad de la quimotripsina.

La actividad en el gel de poliacrilamida tiene una importancia en la definición de la actividad de la enzima ante sustratos generales.

Supervivencia

En relación con la supervivencia (Fig. 2.1) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos del experimento ($p < 0.05$), aunque en todos los casos la supervivencia fue por encima del 95%.

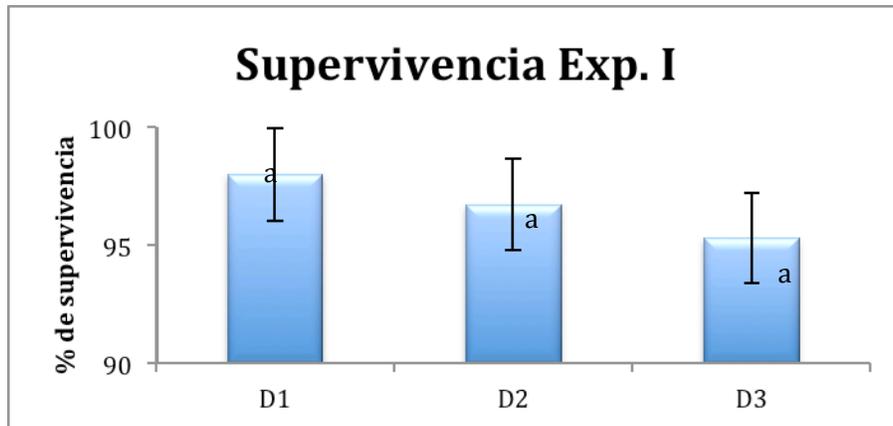


Figura 2.1.- Relación de la supervivencia del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa). *Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

Coefficiente Diario de Crecimiento

En relación con el crecimiento los resultados de la ANOVA de una vía, sí mostraron diferencias ($p < 0.05$). La tasa de crecimiento significativamente más elevada se obtuvo en los juveniles alimentados con el tratamiento D1, mientras que las organismo alimentados con los tratamientos D2 y D3 no fueron estadísticamente diferentes entre sí (Figura 2.2).

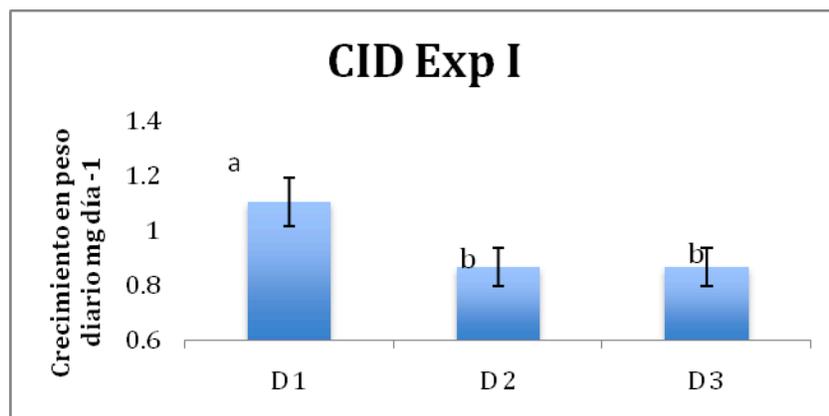


Figura 2.2. Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa). *Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

La diferencia en ganancia de peso es uno de los parámetros más representativos en la investigación pues es un factor muy relevante en la industria al igual que la calidad del producto final (olor, sabor, textura) de la carne de camarones, langosta y cangrejos; La calidad es una característica muy apreciada por cierto sector de la población. (PROFECO, 2006).

6.1.4. Análisis de calidad del producto

Textura

El estudio de la textura del músculo de camarón es fundamental, es por esto que las colas de camarón fueron congeladas por criogenización, lo cual permite una mejor conservación del músculo; La textura de la carne de los camarones que fueron alimentados con los tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa), no presentaron diferencias significativas ante la fuerza de penetración del punzón (tabla 2.8).

Tabla 2.8 Fuerza requerida para la penetración del músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

<u>Tratamiento</u>	<u>Ib/Fuerza</u>
D1	1.2±1.1 ^a
D2	1.9±0.6 ^a
D3	2.1±0.6 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar.

Actividad de la enzima colagenasa

En la Tabla 2.9 se presentan los resultados de la actividad de la colagenasa en músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento I. La actividad enzimática no resultó afectada por los tratamientos dietéticos, de tal manera que todos los juveniles alimentados tanto con la D1, D2 y D3 resultaron iguales ($p < 0.05$).

Tabla 2.9 Actividad de colagenasa en músculo de camarón de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

<u>Tratamiento</u>	<u>Actividad (Unidades/h)*</u>
D1	293± 20 ^a
D2	326± 14 ^a
D3	373± 47 ^a

**Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar.

* μg de leucina liberado en cinco horas utilizando como substrato colágeno tipo I de bovino.

6.2.- Experimento II

6.2.1.- Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA)

En la tabla 2.10 se presentan los valores de los coeficientes de digestibilidad aparente para la proteína, la energía y la materia seca, los cuales no fueron afectados por los tratamientos ($p>0.05$).

Tabla 2.10. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) proteína, energía y de materia seca del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tratamiento	CDA proteína	CDA energía	CDA materia seca
D4	85.3± 2.9 ^a	80.1 ± 3.9 ^a	71.4 ± 5.6 ^a
D5	81.5± 4.9 ^a	81.8 ± 1.1 ^a	74.4 ± 1.6 ^a
D6	83.1± 1.0 ^a	79.5 ± 1.2 ^a	69.0 ± 1.7 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

La digestibilidad entre los tres tratamientos no mostró ninguna diferencia ($p>0.05$), pero cabe resalta que la variabilidad en esta prueba fue baja en el caso del tratamiento D6 la cual muestra la DS más baja en los tres niveles de digestibilidad, mientras que el tratamiento D5 tiene un DS baja en rubro de CDA Energía y de MS mientras que para CDA de proteína es alto, el tratamiento D4 presentó la DS más alta para los tres mediciones de CDA medidos en este experimentos.

6.2.2.- Indicadores fisiológicos

Balance bioenergético

En la Tabla 2.11 se presentan los resultados del modelo del balance bioenergético del experimento II, con los tratamientos D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar), donde se analizaron los valores de HeE, HiE y RE. con una ANOVA de una vía.

La HeE más elevada se obtuvo en los juveniles provenientes del tratamiento D6, que representó el 51% de la ED (Tabla 2.12 $p<0.05$), mientras que para las dietas D4 y D5 no se observaron diferencias (>0.05) para la HeE.

En relación con el HiE, el tratamiento D4 presentó el máximo valor, que representó el 31.9% de la ED (Tabla 2.12, $p<0.05$), mientras que no se observaron diferencias entre los tratamientos D5 y D6. Sin embargo en lo que respecta a la retención de energía (RE) para el crecimiento, los valores fueron similares entre los organismo de los 3 tratamientos ($p>0.05$).

Tabla 2.11. Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tratamiento	Valor ED	HeE	HiE	UE + ZE	RE	EEXV
D4	1669.0 ± 57.4 ^a	384.48 ± 7.07 ^a	532.9 ± 44.9 ^a	135.4 ± 4.74 ^a	586.4 ± 144.8 ^a	29.32 ± 7.3 ^a
D5	1870.1 ± 85.0 ^b	935.06 ± 67.5 ^b	224.3 ± 9.8 ^a	152.0 ± 7.02 ^b	529.5 ± 71.5 ^a	28.68 ± 3.9 ^a
D6	2008.4 ± 127.8 ^b	1033.8 ± 106.7 ^b	198.0 ± 9.9 ^a	163.2 ± 10.55 ^b	581.4 ± 67.4 ^a	31.5 ± 3.6 ^a

ED (energía digerible calculada); HeE (energía de la respiración de rutina en ayuno; HiE (energía del incremento de calor aparente); UE (excreción amoniaca de ayuno); ZE (energía de excreción amoniaca post-alimentaria); RE (retención de energía para el crecimiento) EEXV (energía estimada para la muda)

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

En la Tabla 2.12 se presentan los valores en % de la Tabla 2.10, para así tener una presentación de los datos, donde se haga más fácil las observaciones de las diferencias

Tabla 2.12. Modelo del balance bioenergético en % del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tratamiento	Dieta	Valor ED	HeE	HiE	UE + ZE	RE	EEXV
D4	<i>Spirulina</i>	100 ± 3.4 ^a	23.0 ± 0.4 ^a	31.9 ± 2.7 ^a	4.7 ± 0.3 ^a	35.1 ± 8.7 ^a	1.8 ± 0.4 ^a
D5	Coctel	100 ± 4.5 ^b	50.0 ± 3.6 ^b	12.0 ± 0.5 ^a	7.0 ± 0.4	28.3 ± 3.8 ^a	1.5 ± 0.2 ^a
D6	Calamar	100 ± 6.4 ^b	51.5 ± 5.3 ^b	9.9 ± 0.5 ^a	10.6 ± 0.5	28.9 ± 3.4 ^a	1.6 ± 0.2 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

Las DS más grandes son de nuevo en la D4 lo que corresponde al comportamiento que se observó en la digestibilidad.

Parámetros bioquímicos

En la Tabla 2.13 se presentan los resultados de la proteína soluble y las actividades específicas de la tripsina y la quimotripsina de los juveniles alimentados con las dietas D4, D5 y D6. El ANOVA no detectó diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) ni en relación con la proteína soluble, ni para las 2 enzimas analizadas (Tabla 2.13).

Tabla 2.13 Proteína total soluble (mg/ml) y actividad específica de la tripsina (mU/mg de proteína) y la quimotripsina (mU/mg de proteína) del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tratamiento	proteína total soluble	tripsina	quimotripsina
D4	1.8 ± 0.5 ^a	9.9 ± 7.3 ^a	79.4 ± 27.6 ^a
D5	1.5 ± 0.3 ^a	10.1 ± 4.6 ^a	84.1 ± 28.4 ^a
D6	1.7 ± 0.4 ^a	9.4 ± 3.9 ^a	74.3 ± 26.1 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

La DS presente en la quimotripsina vuelve a ser más alta, teniendo el mismo comportamiento que en el experimento I, al igual que la proteína presenta los valores más bajos de DS y que la tripsina teniendo valores intermedios.

Electroforesis de la tripsina y la quimotripsina

En el caso de la técnica de electroforesis tenemos que los organismos sometidos a los tratamientos D4 y D6 presentan dos bandas mientras que los organismos sometidos al tratamiento D5 muestran una sola banda, lo cual puede sugerir la diferencia de *L. vannamei* para la asimilación de las diferentes fuentes de proteína, teniendo una mayor expresión en las dietas de proteínas unitarias (Figura 2.6).

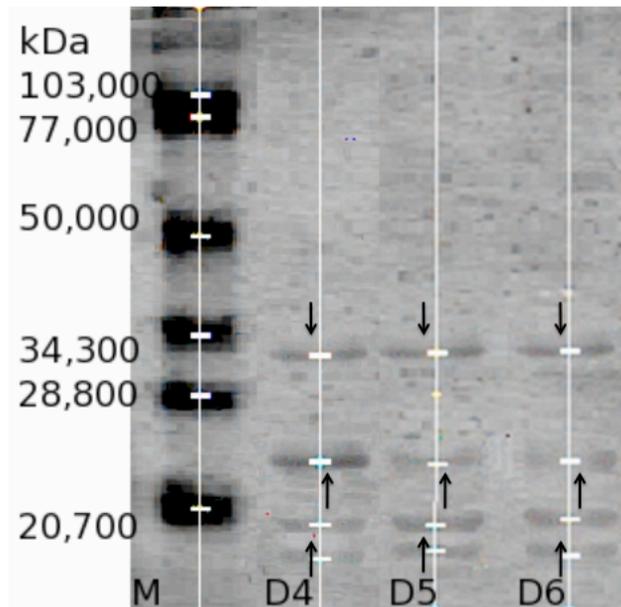


Figura 2.6. SDS PAGE gel realizado con puelles de hepatopáncreas de *L. vannamei*: MWM marcador de peso molecular, Línea 1 banda de camarones alimentados con la D4 (*Spirulina*), Línea 2 banda de camarones alimentados con la D5 (coctel vegetal) y Línea 3 banda de camarones alimentados con la D6 (Harina de calamar). Las flechas que señalan hacia arriba muestran la actividad de la tripsina, y hacia abajo la actividad de la Quimotripsina.

Supervivencia

El análisis de varianza aplicado al porcentaje de supervivencia no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Fig. 2.4).

El coeficiente diario de crecimiento (CDC % día⁻¹), sí mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). El crecimiento más elevado se presentó en el tratamiento D4, mientras que el valor menor se presentó en el tratamiento D5 ($p < 0.05$). Y el tratamiento D6, no mostró diferencias significativas con las dietas D4 y D5 ($p > 0.05$). (Figura 2.5)

El crecimiento es uno de los parámetros más importantes para la industria acuícola por lo que al tener una respuesta positiva con las fuentes de origen vegetal surge el gran potencial para sustituir la proteína de origen animal marino.

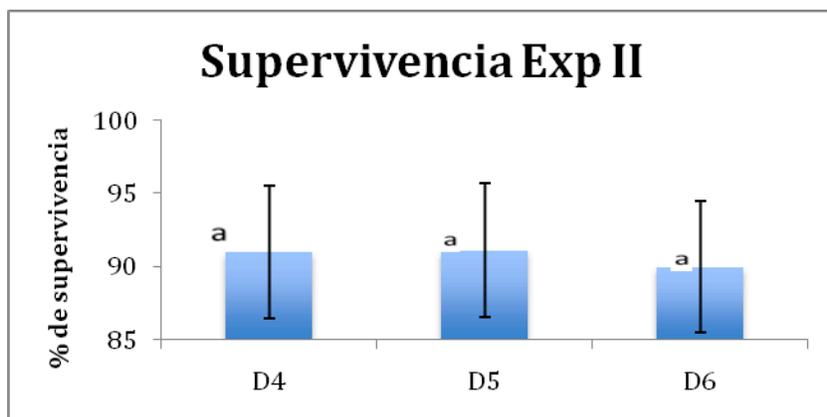


Figura 2.4.- Relación de la Supervivencia (%) del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

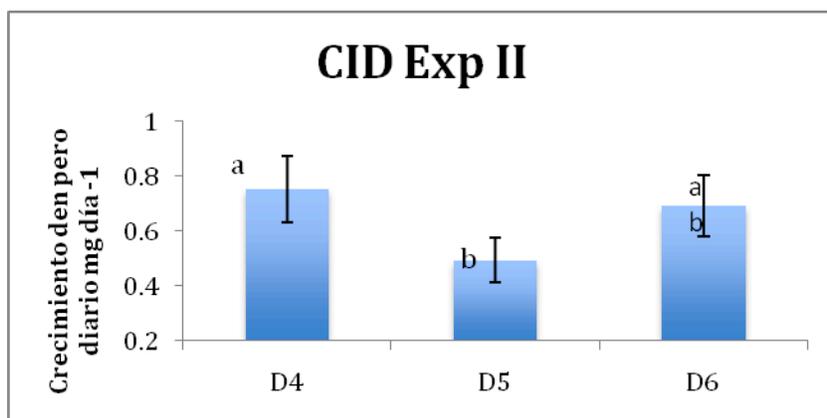


Figura 2.5.- Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

6.2.4. Análisis de calidad del producto

Textura

Al igual que en el experimento anterior el manejo fue en base al congelamiento por criogenicéis, lo cual permitió una mejor conservación del músculo; La textura de la carne de los camarones que fueron alimentados con las dietas *Spirulina*, Coctel y Calamar no presentaron diferencias significativas ante la fuerza de penetración del punzón (tabla 2.14).

Actividad de la enzima colagenasa

En la Tabla 2.15 se presentan los resultados de actividad de la colagenasa en músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento II. La actividad enzimática no resultó afectada por los tratamiento dietéticos ($p < 0.05$).

Tabla 2.14 Fuerza requerida para la penetración del músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tratamiento	Dieta	Ib/Fuerza
D4	<i>Spirulina</i>	1.0±1.1 ^a
D5	Coctel	1.3±0.6 ^a
D6	Calamar	1.2±0.6 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

Tabla 2. 15 Actividad de la colagenasa en músculo de camarón de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

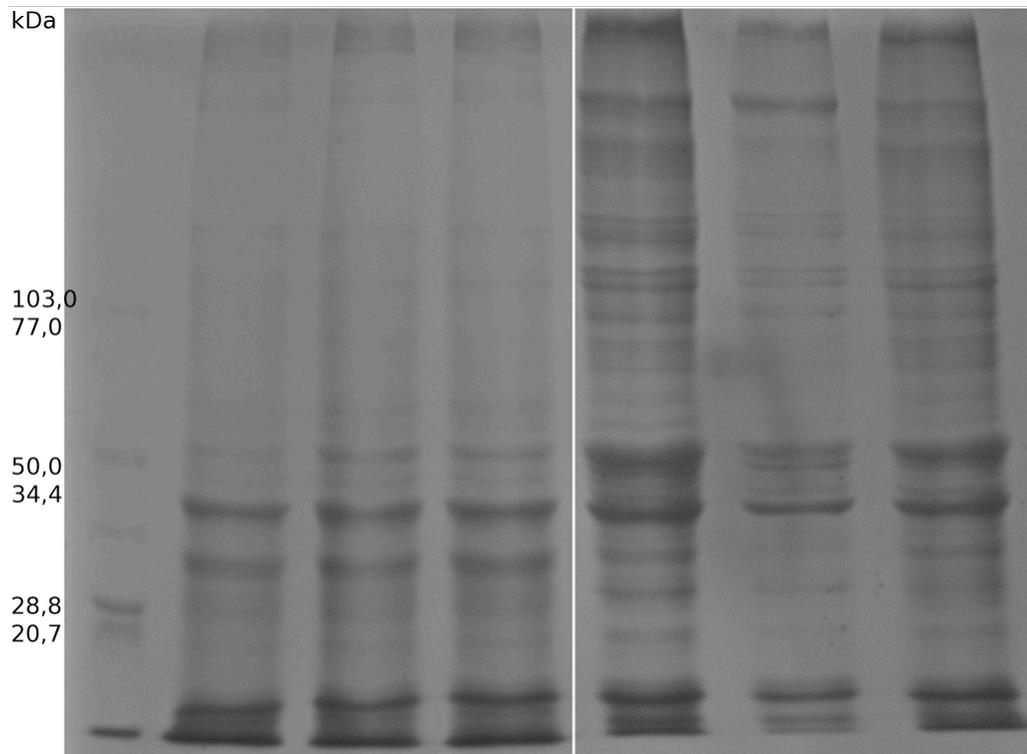
Tratamiento	Dieta	Miofibrilares (mg/ml)
D4	<i>Spirulina</i>	353 ± 84 ^a
D5	Coctel	286 ± 40 ^a
D6	Calamar	266 ± 10 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ±Error estándar, con una n de 3.

* μg de leucina liberado en cinco horas utilizando como substrato colágeno tipo I de bovino.

Con el fin de tener un conocimiento general de las estructuras de las proteínas miofibrilares presentes en los dos experimentos se tomó la primera fracción del colágeno para el análisis es decir la solución salina la cual no presentó diferencias significativas (Fig. 2.7).

Esto fue porque el colágeno de organismos acuáticos, es altamente soluble en soluciones salinas, en ácidos diluidos y soluciones amortiguadoras ácidas, a diferencia del colágeno proveniente de mamíferos terrestres que son poco solubles en tales disolventes (Eckhoff *et al.*, 1998).



MM D. Soya D. Trigo D. Papa D. *Spirulina* D. Coctel D. Calamar

Figura 2.7 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes del colágeno extraído del camarón (*L. vannamei*). Carril A: marcador de peso molecular; B: colágeno soluble en sal extraído del músculo de la D. soya; C: colágeno soluble en sal extraído músculo de D. trigo; D: colágeno soluble en sal extraído del músculo del D. papa; E: colágeno soluble en sal extraído músculo de D. *Spirulina*; F: colágeno soluble en sal extraído músculo de D. Coctel; G: colágeno soluble en sal extraído músculo de D. Calamar.

7.- Discusión

A partir de los resultados obtenidos en los dos experimentos que comprenden este capítulo, se puede señalar que la hipótesis propuesta se cumple, ya que los juveniles *L. vannamei* digirieron de forma eficiente (como lo demuestran el análisis de digestibilidad, parámetros fisiológicos y el análisis bioenergético) tanto las fuentes de proteína vegetal, como la proteína de origen animal marina, que se ha considerado como una fuente de alta digestibilidad para *L. vannamei* (Ezquerro *et al.*, 1998).

Análisis de la digestibilidad in vivo (%AIA).

Para denotar la importancia y las variaciones que tiene el análisis de la digestibilidad, hay que tener presente que los organismos digieren de manera diferente los ingredientes presentes en el alimento, y estas diferencias se hacen más evidentes cuando no presentan la misma composición química las fuentes que constituyen el alimento, y más cuando los ingredientes tienen diferente origen, estas diferencias se hacen patentes tanto en el análisis bromatológico como en los CDA_{proteína}, y CDA_{ms} (Herrera, 2008), ya que estos dos parámetros son indicativos de la capacidad de los organismos para poder digerir y asimilar los ingredientes de una dieta (Brunson *et al.*, 1997), la digestibilidad de la materia seca es un buen indicativo del grado en que un ingrediente es digerido y absorbido por el tracto digestivo del animal (Siccardi III *et al.*, 2006)

Akiyama *et al.*, (1989) han establecido que la digestibilidad de la proteína de ingredientes semi-purificados o concentrados proteicos es superior a los no purificados, y a las fuentes de origen animal. Es por eso que las dietas que están compuestas con este tipo de ingredientes presentaron valores altos, lo cual concuerda con lo dicho por Nieto (2003) el cual menciona que el camarón puede absorber rápidamente componentes pre-hidrolizados.

Los ingredientes purificados tuvieron los más altos valores para CDA_{proteína}, CDA_{ms} y CDA_{energía} en el presente estudio lo que concuerda con lo reportado por otros autores para la misma especie e incluso para otras (*L. vannamei*: Akiyama *et al.*, 1989; *P. monodon*: Shiau *et al.*, 1992; *Palaemon serratus*: Forster y Gabbott, 1971; *Panadalus platyceros*: Forster y Gabbott, 1971; *Procambarus clarkia*: Brown *et al.*, 1986).

Sin embargo hay que tener cuidado con los valores obtenidos ya que al tratarse de un producto prehidrolizado, su tasa de lixiviación es muy alta, debido a la alta solubilidad en el

agua de la proteína hidrolizada, lo que conlleva en ocasiones a sobreestimar la digestibilidad, es por esto que se hizo una evaluación más completa del impacto de las dietas en los tratamientos que se probaron en este estudio.

Por ejemplo la naturaleza omnívora de *L. vannamei* y su capacidad de adaptación a fuentes proteicas de origen vegetal se ha visto en estudios *in vitro* donde se ha determinado una mayor digestibilidad de proteínas de origen vegetal que de origen animal (Ezquerria *et al.*, 1997 b), y otros donde se reportan diferencias entre proteínas de origen vegetal y animal suministrado a *L. vannamei* (Smith, 1985). Estos resultados se contraponen a los coeficientes de digestibilidad (CAD) proteico significativamente más bajos de harina de origen vegetal, en comparación de harinas de origen animal marino encontradas para *P. serratus* y *P. platyceros* (Forster y Gabbot, 1971) y *L. stylirostris* (Fenucci *et al.*, 1982) mostrando así la plasticidad de *L. vannamei* a las fuentes alternativas para su alimentación.

Experimento I

En el Experimento I, se puede señalar que la fuente de proteína más eficiente fue el concentrado proteico de soya; Ezquerria *et al.*, (1997 b) señala que el alto valor de digestibilidad de la proteína de soya, muestra que es mejor digerida, que la proteína de la harina de pescado. La proteína de las harinas de soya presenta una mayor digestibilidad (Siccardi III *et al.*, 2006) que algunas harinas de pescado y otras fuentes de origen marino. Y esto es por su alto contenido de aminoácidos esenciales, sólo presentando deficiencia en la metionina y lisina (Tacon *et al.*, 1993). Además se reporta un elevado contenido de vitaminas, lo cual lo hace un ingrediente con un alto potencial en la sustitución de fuentes de proteína de origen marino. (Akiyama *et al.*, 1992).

Anteriormente el problema para el uso de esta fuente para la alimentación de los camarones, estaba situado en sus altos contenidos de factores anti-nutricionales (FAN); La lectina de la soya es resistente al tratamiento con calor seco; por este motivo en algunos tratamientos de la soya existe un residuo de lectina activa. La soya también contiene fitoestrógenos, caracterizados químicamente como isoflavonas (genisteína, genistina, daidzeina, daidzina, gliceteína y glucósido de gliceteína). La soya posee otros compuestos fenólicos que se considera que determinan el olor y sabor desagradable, pero que no son tóxicos (Maga y Lorenz, 1973) Además de los inhibidores de tripsina, hay varios FAN y compuestos alergénicos que están asociados a la fracción de carbohidratos, tales como la

glicina, betaconglucina, oligosacáridos, lectinas y saponinas (Liener, 1994)

Sin embargo, los diferentes procesamientos actuales con calor como tostado extrusión y peletización, inactivan o eliminan exitosamente estos FAN (Lim y Akiyama, 1993).

Los valores de CDA_{proteína} y CDA_{ms} de la pasta de soya concuerdan con los valores mínimos reportados por otros autores (Akiyama *et al.*, 1989; Ezquerro *et al.*, 1997 a; Ezquerro *et al.*, 1998; Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2001; Siccardi III *et al.*, 2006), los cuales también señalan el alto potencial de este ingrediente para su uso en las dietas artificiales de *L. vannamei*.

En el caso de la CAD_{proteína} los tratamientos no presentaron diferencias significativas solo una tendencia de parte del t. D1 y del t. D3 sobre el t. D2, este punto puede tener su razón en el hecho de que los dos ingredientes de las dietas usadas en los tratamientos D1 y D3 son concentrados proteicos lo cual aumenta su digestibilidad aparente, por ende mejora el aprovechamiento de la energía y algunos nutrientes de la dieta (Coelho y Massamit-Furuya, 2005), lo cual concuerda con los reportes donde se han encontrado no solamente valores más altos para el CDA_{proteína} sino también para el CDA_{ms} y CDA_{energía} de estos ingredientes purificados (Akiyama *et al.*, 1989). *P. monodon* (Shiau *et al.*, 1992;) *Procambarus clarkia* (Brown *et al.*, 1986), pero hay que tener en cuenta que estos ingredientes son altamente digeribles, pero su perfil aminoacídico no está completo (Siccardi III *et al.*, 2006).

Los valores reportados por autores como Siccardi III *et al.*, (2006) dan valores de CDA_{ms} que van desde los 41.8 – 96.8 %, siendo los ingredientes purificados los de mayor valor, lo mismo se observa con el tratamiento D1 el cual tiene los valores más altos en dicho experimento, pero sin diferencia significativa con los otros dos tratamientos.

Hay que ver que la harina de soya presenta valores CAD_{ms} que varían de 61.2 y 84.7% para *L. vannamei*, esta diferencia en la digestibilidad podría ser consecuencia del porcentaje de inclusión (Divakaran *et al.*, 2000). Otro reporte de digestibilidad que va desde el 55.9 al 84.1 % para *L. vannamei* (Akiyama *et al.*, 1989) el cual depende del nivel de purificación de la soya, este incremento puede deberse a la proteína altamente digerible de estos ingredientes.

El valor de CAD_{energía} que presentó la soya en este trabajo es bajo a comparación de otros trabajos (Divakaran *et al.*, 2000), pero los valores del t. D1 y t. D2 son similares a los reportados por Davis *et al.*, (1993) para *L. vannamei*, estos autores mencionan que los CAD de ingredientes pueden variar en función de las condiciones ambientales y fisiológicas bajo

las cuales se dan las mediciones, pero aun así, CAD permite la determinación de un intervalo definido para cada ingrediente y provee una medida valiosa para formular dietas de bajo costo y amigables con el ambiente.

Para el caso de los organismos alimentados con el tratamiento D2 que usó como fuente alternativa el gluten de trigo no presentó diferencias en el $CDA_{\text{proteína}}$ y CDA_{ms} . El uso de este ingrediente se tiene que tomar con las siguientes reservas como son: aminoácidos limitantes (lisina y valina), la mayoría del fósforo está en forma de fitatos lo que disminuye su bio-disponibilidad y sus factores FAN detectados son Fitohemaglutininas, ácido fítico, factor flatulento, inhibidor de amilasa y posible contaminación con aflatoxinas. (Tacon, 1989).

Sin embargo son buenas fuentes de vitaminas del complejo B, teniendo en cuenta estos puntos hay que usar semilla con un tratamiento que inactive los FAN para evitar resultados negativos como son bajo crecimiento y pobre utilización de la proteína para diferentes especies acuáticas (Wilson y Poe, 1985), además el gluten de trigo es un excelente aglutinante y una buena fuente de proteínas ya que contiene un mínimo del 60% (Akiyama *et al.*, 1992).

Los valores de digestibilidad de materia seca y proteína de los ingredientes de origen vegetal no mostraron diferencias entre ellos (rango 68% - 75% materia seca; 63% – 74% proteína) lo cual nos puede indicar que *L. vannamei* tiene la capacidad para utilizar esta fuente de manera adecuada como fuente de energía (Akiyama *et al.*, 1989).

El $CAD_{\text{energía}}$ del gluten de trigo en este trabajo es bajo, pero hay que tomar en cuenta un variación de valores de $CDA_{\text{proteína}}$, $CAD_{\text{energía}}$ y CDA_{ms} de ingredientes dependiente del tipo de procesamiento al cual sea sometido cada insumo, es por esto que la capacidad de un organismo para asimilar dicha fuente será diferente dependiendo del tipo de procesamiento para obtener el gluten de trigo (Davies y Arnold, 1995).

El $CAD_{\text{energía}}$ tuvo el mismo resultado que $CAD_{\text{proteína}}$ correspondiendo así con lo propuesto en las dietas que son tanto isoproteicas como isocalóricas, teniendo en cuenta que la mayor parte de la energía de los ingredientes analizados proviene precisamente de la proteína.

En el caso de los organismos alimentados con el tratamiento D3 donde se utilizó el concentrado proteico de papa, presentaron los valores más altos para $CDA_{\text{proteína}}$ y $CAD_{\text{energía}}$ lo cual puede deberse al buen procesamiento de dicha fuente, es decir el concentrado

proteico usado es de alta calidad, su pureza lo hace de muy fácil digestión por parte del animal y esto se debe a que la harina de papa es una fuente de primer nivel de proteína debido a su alto contenido proteico combinado con su excelente digestibilidad y a su contenido superior de aminoácidos esenciales balanceados, el perfil de los aminoácidos no está solamente bien balanceado sino que también es muy alto. Esto particularmente aplica a lisina, metionina, treonina y triptofano. El nivel de aminoácidos es más alto que en otras proteínas de alimentos para animales.

Experimentos han demostrado que el valor nutricional de la harina de papa es superior a la harina de soya e igual a la leche descremada en polvo (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000, 2000 a y 2000 b).

Analizando los resultados para CAD_{ms} los cuales no presentan diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, lo que nos da un buen referente en que los tres insumos usados muestran un gran potencial.

Los valores de CAD_{ms} es un buen estimativo del grado en que un ingrediente es dirigido y absorbido por el tracto digestivo (Brunson *et al.*, 1997); la falta de diferencias ($p > 0.05$) entre los tratamientos de origen vegetal del experimento I, sugiere que *L. vannamei* puede utilizar estas fuentes de nutrientes con eficiencia, en tanto sean suministrados en niveles razonables.

Experimento II

En el caso del Experimento II tenemos el tratamiento D4 el cual usa la *Spirulina* como base de su dieta, tiene características importantes tales como su gran valor proteico (55-70%), sus vitaminas, aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos y pigmentos, antioxidantes, como los carotenoides (Belay *et al.*, 1996 y Falquet, 1996), lo que la hace un insumo de alto potencial para sustituir fuentes de proteína de origen animal marino.

La respuesta de dicho tratamiento para los valores de $CDA_{proteína}$ fueron altos lo cual puede estar relacionado con la forma y el tamaño de partículas que componen dicha fuente, pues como lo reportan Siccardi III *et al.*, (2006), dependiendo de la forma y tamaño de una fuente esta puede tener mayor área superficial para la acción digestiva de las enzimas.

En el caso del $CAD_{energía}$ y CDA_{ms} presenta valores intermedios, sin diferencias significativas con los otros dos tratamientos lo cual reitera la posibilidad de usar en las dietas para *L. vannamei* ya que como se a dicho estos coeficientes pueden variar por diferentes factores, pero reflejan el aprovechamiento de los organismos a dicha fuente.

En el tratamiento D5, que es la combinación de los insumos antes estudiados, se puede ver un efecto asociativo Brown *et al.*, (1989) el cual se puede entender como el cambio de la digestibilidad de un ingrediente (o compuesto específico de dicho ingrediente y/o dieta) al adicionarle otro, en donde dicha asociación puede ser positiva (aumento de disponibilidad) o negativa (disminuye disponibilidad), estas características se ponen de manifiesto en dicha dietas.

El efecto asociativo puede ser la causa de que no se presenten diferencias ($p > 0.05$) en CDA_{proteína}, CAD_{energía} y CDA_{ms}, comparándolas con la D. calamar (D6), ya que dicho tratamiento (D5) cuenta con todas las propiedades positivas de las fuentes vegetales, las cuales tiene un alto potencial de digestibilidad.

Por ejemplo en el caso del CDA_{proteína} que no presenta diferencias significativas entre los tratamientos (D4, D5 y D6), se puede suponer que el efecto asociativo (Brown *et al.*, 1989) se hace presente, muestra de este efecto son casos como el de la harina de camarón que resultó ser una mejor fuente de proteína para *P. indicus* que la harina de pescado (Colvin, 1976), pero una mezcla de las dos resulta ser todavía mejor. Otro ejemplo de este efecto de combinación es donde se reporta una menor digestibilidad proteínica de la harina de langostilla a la obtenida con una harina de anchoveta (73% y 84% respectivamente) en juveniles de *L. vannamei* (Ezquerria *et al.*, 1997 a). Sin embargo al incluir harina de langostilla como sustituto de harina de desechos de atún en dietas para juveniles de *L. vannamei* (Goytortúa, 1993), reportó un incremento significativo en la digestibilidad proteínica al compararlos con los obtenidos con la dieta de referencia sin harina de langostilla, es por estos ejemplos que podemos pensar que la combinación de los ingredientes purificados le dan el valor más alto en la parte de CDA_{ms} la cual de nuevo muestra que esta dieta es bien absorbida en el tracto digestivo del organismo.

En el caso del tratamiento D6 existen pocos estudios que hagan referencia al uso de harina de calamar y menos acerca de su valor digestivo, Akiyama *et al.*, (1989) reportó valores que van desde 68.9% y 79.7% de materia seca y proteína respectivamente. Un estudio más reciente publicado por Siccardi III *et al.*, (2006) analizó cinco tipos de harina de calamar (una harina de hígado, dos harinas de músculo y dos harinas de calamar entero) los resultados obtenidos se encuentran en el rango de 61.8%–74.7% de digestibilidad de materia seca y 66.4%–86.6% de proteína. En el actual estudio, se obtienen valores dentro de los

rangos antes mencionado para el caso de CDA_{ms} con valores del 69%, pero los valores para el $CDA_{proteína}$, fueron superiores con valores del 83%. Siccardi III *et al.*, (2006) menciona que el mayor contenido de proteína se encuentra en la harina obtenida a partir del músculo y esta proteína es altamente digestible, así que los resultados obtenidos en este estudio pueden atribuirse a una buena calidad de la harina de calamar que probablemente fue obtenida totalmente de músculo.

Como indicativo de la calidad de dicho insumo tenemos que el valor para CDA_{ms} para el tratamiento D6 el cual contiene calamar presentó un valor bajo, sin diferencias con los otros dos tratamientos, esto pudo deberse a la cantidad de cenizas que se encontró en dicha fuente las cuales pueden afectar la calidad, es decir de nuevo se tiene que tomar en cuenta el proceso que se utilizó para la obtención de dicha harina de calamar.

Indicadores fisiológicos

Parámetros del balance Bioenergético

Con respecto a análisis de balance bioenergético los parámetros evaluados fueron (HeE, HiE) y RE, pues son estos valores los que nos proporcionan un idea de la energía usada por el organismo. Es a partir de estos coeficientes calculados los que nos permiten estimar las pérdidas de energía derivadas de los cambios en la composición del alimento suministrado a los organismos (Gaxiola, 1994). El gasto de energía debido a la alimentación se refiere con diferentes términos: incremento de calor por alimentación (HiE) e incremento calórico aparente (ICA), pero este fenómeno se refiere a la ingestión de comida por animal que ha sido mantenido en ayuno, produciendo así un incremento en la producción del calor acción dinámica específica.

Los factores que contribuyen al incremento del calor por alimentación son: (i) Formación y excreción de desechos metabólicos ya que la principal base bioquímica para el incremento del calor es la energía requerida para la desaminación y excreción del nitrógeno ingerido en forma de amoníaco (Kleiber, 1975) (ii) Transformación e interconversión de sustratos y sus retención en tejidos; se incluyen los procesos postabsortivos relacionados con la ingestión del alimento, particularmente del alimento rico en proteína, así como la síntesis de proteínas y grasas en los tejidos a partir de sustratos recién absorbidos derivados del alimento como aminoácidos y ácidos grasos y a la suma de estos dos factores, se le conoce como trabajo

metabólico y (iii) A los procesos de digestión y absorción donde los gastos de energía asociados a estos procesos son muy pequeños comparados con los dos anteriores (Emmans, 1994). Este HiE puede variar del 10% al 50% en relación con la calidad de la fuente proteica.

En relación a la energética de la respiración (HeE+HiE), tenemos que es la cantidad de oxígeno consumido, lo cual la convierte en buen indicador de la energía disponible para procesos biológicos, y en particular nos muestra la cantidad de energía que se presenta en la etapa de ayuno (HeE) y en la etapa postprandrial (HiE). Lo cual permite la determinación de los destinos energéticos provenientes de los alimentos ingeridos (Rosas *et al.*, 1999) y es este mismo autor el cual señala que los camarones peneidos están estrechamente ligados al metabolismo de las proteínas, ya que han demostrado una muy amplia capacidad para utilizar a este sustrato como fuente básica para la obtención de energía y el crecimiento (Rosas *et al.*, 2000)

Experimento I

En el caso de la tasa metabólica basal (HeE) del experimento I, no presentó diferencias significativas, esto puede corresponder a que los organismos, alcanzaron una tasa metabólica basal absoluta, la cual no muestra diferencias, pues los organismos al tener un ayuno de más de 12 horas tenían el mismo comportamiento metabólico lineal, ya que como lo mencionan algunos autores *L. vannamei* presenta un uso de los nutrientes continuo y un paso del tracto de no más de 4 horas por eso se está asegurando que la energía usada para dicha fase era de reserva, es decir que las dietas elaboradas para los tres tratamientos pueden ser absorbidas por *L. vannamei*, de la misma forma cumplen con sus necesidades de mantenimiento para el proceso de vida.

Los organismos del tratamiento D2 y D3 obtuvieron los mayores valores en la energía utilizada en HiE, lo cual puede ser atribuido a la diferencia en la capacidad de digestibilidad de la proteína, provocando que los organismos retuvieran por mayor tiempo el alimento como una estrategia para digerir y aprovechar al máximo los elementos contenidos en las mismas, conllevando a diferencias de uso de energía, esto se pudo apreciar en el tiempo en que tardaron los organismos alimentados con estos tratamientos en regresar a su estado de rutina el cual fue de 6 horas después de ser alimentados, mientras que los animales alimentados con el tratamiento D1 solo tardaron 4 hr. en regresar a su estado de rutina.

Pascual *et al.*, (2004), encontraron resultados similares, en un estudio que compara 3 niveles diferentes de proteína del mismo origen 5%, 15% y 40%, donde los valores de respiración disminuyen según el incremento en el nivel de la proteína dietética, con altos valores en camarones alimentados al 5% y valores bajos en camarones alimentados con 40%, corroborando que los camarones alimentados al (40%) fueron metabólicamente más eficientes debido a que el camarón utiliza menos energía. Por lo tanto, la energía disponible para el crecimiento fue más alta en los organismo alimentados con la cantidad de proteína ideal que para los camarones alimentados con una proteína deficiente, en el estudio no existe una diferencia en la cantidad de proteína, pero sí en su calidad por lo cual concuerda con los propuesto por Beamish y Tripple, (1990), los cuales mencionan que un menor tiempo en el proceso del HiE puede estar relacionado con la eficiencia de asimilación de los nutrientes ingeridos, lo que conlleva a altas tasas de crecimiento, resultado de mínimos gastos de energía, tal y como se manifiesta en los organismos alimentados con el tratamiento D1.

Lo antes mencionado del uso de la proteína se relaciona positivamente con el valor de RE, ya que el tratamiento que presenta el valor más elevado es D1, y es este valor el cual se puede ver de manera tácita en el CID donde el tratamiento D1 presenta el mejor desempeño, y los tratamientos D2 y D3 presentan un valor por debajo del t. D1, lo cual se indica en la tasa de crecimiento que también fue baja para dichos tratamientos.

En el caso de la energía usada para la excreción amoniacal se puede ver que los valores presentan diferencias entre todos los tratamientos, esto puede ser debido a un incremento de aminoácidos provenientes de la dieta con fines de energía metabólica, ya que se ha demostrado que conforme varía la proteína de la dieta, hay diferencias significativas de la excreción de amonio. (Rosas *et al.*, 2000 b).

Experimento II

Para el caso del experimento II tenemos que los valores de HeE donde el tratamiento D4 presenta un valor por debajo (un tercio) a los otros tratamientos, puede sugerir que podría tener una tasa metabólica menor que los t. D5 y t. D6 en juveniles de *L. vannamei*, lo cual se correlación positivamente con los valores presentados en la tasa de crecimiento pues es el t. D4 el que presenta mejor rendimiento, ya que la energía que no gasta en rutina la puede dirigirla a la RE.

Con respecto al valor obtenido de RE para los diferentes tratamientos tenemos una

correlación positiva con la CDA para los tratamientos D4 y D6 los cuales denotan un crecimiento óptimo, teniendo valores iguales en su RE, pero el tratamiento D5 tiene una correspondencia negativa con la tasa de crecimiento ya que es la más baja, lo cual puede ser porqué los suplementos proteicos vegetales de origen terrestres son más pobres en energía que las harinas de pescado. También hay que mencionar que la disponibilidad de fósforo es considerablemente más baja en los productos vegetales que en los animales y difiere significativamente entre especies. De igual manera algunas proteínas vegetales presentan niveles sub-óptimos en los perfiles de aminoácidos esenciales y la mayoría podrían presentar FAN (Akiyama *et al.*, 1991) y son estas acumulaciones de características las cuales se tiene que contemplar a la hora de la formulación.

Otro punto que puede hablar de la factibilidad de la *Spirulina* que es la fuente usada en el tratamiento D4 la cual presenta los valores de aminoácidos óptimos los que concede a este insumo una mejor asimilación por parte del *L. vannamei*. en el caso de los tratamientos D5 y D6 que no tiene diferencias entre ellos pero presentaron valores superiores a los del t. D4 puede ser porqué la estructura de los nutrientes en estas dietas son de mayor dificultad para asimilar.

Parámetros bioquímicos

Experimento I

La actividad enzimática específica se expresa en base a la proteína, por lo tanto, esta actividad sigue el mismo patrón que la concentración de la proteína soluble con respecto al crecimiento (Le Moullac *et al.*, 1994). En el presente estudio se observó una correlación positiva, de la afirmación anterior pues fue el tratamiento D1 el que ostenta una mayor cantidad de proteína soluble en el hepatopáncreas y el mayor crecimiento. Este hecho está relacionado al aumento de volumen que experimenta el hepatopáncreas durante el crecimiento (Lovett y Felder, 1989).

Ha sido hipotetizado que la actividad enzimática digestiva es alta para aquellos sustratos que son más comunes en la dieta (Cox, 1981; Johnston y Yellowlees, 1998). Sin embargo, estudios sobre la relación existente entre la actividad enzimática y los supuestos sustratos alimenticios son controversiales porque estudios en larvas y postlarvas de *M. japonicus* (Rodríguez *et al.*, 1994; Lemos y Rodríguez, 1998) sugiere que puede ocurrir una secreción alta de enzimas para maximizar el uso de un componente escaso en la dieta. A pesar de esta

controversia, se toma en consideración el estudio de la actividad enzimática como un indicador del estado trófico (Galgani *et al.*, 1985) debido a que los tipos y las propiedades de las enzimas digestivas de los camarones definen capacidades digestivas (Divakaran y Ostrowski, 1990). Por ejemplo, Rodríguez *et al.*, (1994) describieron influencias individuales e interactivas en la alimentación herbívora y zooplanctívora sobre la composición bioquímica de larvas de *M. japonicus* y la respuesta adaptativa de la actividad enzimática digestiva ante la dieta. Lee *et al.*, (1980) observaron una alta proporción de la actividad de la proteasa refleja un comportamiento alimenticio carnívoro, mientras que una alta proporción de actividad carbohidrasa es característica de herbívoros. Una combinación de ambas es encontrada en omnívoros.

A pesar de que en organismos vertebrados existe una correlación entre las actividades de la tripsina y la quimotripsina (Lhoste *et al.*, 1994), varios ensayos con crustáceos han resultado negativos en cuanto a la identificación de esta correlación. Le Moullac *et al.*, (1996) no encontraron ésta correlación en juveniles de *L. vannamei*, mientras que Guzman *et al.*, (2001) determinaron una correlación significativa ($r= 0.71$) en postlarvas de *L. setiferus*. En el caso de la tripsina tenemos que los resultados de este trabajo concuerdan con los de Rodríguez *et al.*, (1994) y Lemos y Rodríguez, (1998), los cuales mencionan que los organismo responden aumentando la secreción de una enzima cuando el sustrato es nuevo o deficiente, es por esto que se puede ver que en el caso del tratamiento D2 que es la fuente más pobre en el valor $CDA_{\text{proteína}}$, también es la de mayor actividad en la tripsina presentando una diferencia significativa con los otros dos tratamientos.

Lee y Lawrence, (1985) consideran que el incremento en la actividad enzimática digestiva puede tener una relación negativa con el crecimiento corporal y la digestibilidad de la dieta, y en el caso del tratamiento D2 la actividad de la tripsina presentó diferencia significativa entre los dos tratamientos, corroborando lo dicho por los autores antes mencionado. Los resultados obtenidos en el presente y otros estudios (Le Moullac, 1995), no permiten afirmar de forma general que la actividad enzimática digestiva tiene una relación negativa con el crecimiento corporal, ya que para algunas enzimas parece ser este el caso (proteasas, tripsina) pero otras no presentan un incremento en su actividad respecto al tamaño corporal o fuente de alimentación (lipasa, quimotripsina), es tal vez por esto que en este estudio la quimotripsina no presentó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos.

Experimento II

En el experimento II los organismos usados fueron mayores a los usados en el experimento I, a lo que se atribuye que la relación de proteína soluble cambia de manera notable ya que como lo menciona Lee *et al.*, (1984) consideran que *L. vannamei* experimenta un cambio en su régimen dietario cuando alcanza los 10 a 20 g de peso debido a que observaron diferencias en las respuestas de las enzimas proteasas ante la calidad de la proteína en tres tamaños diferentes de camarones, por lo tanto concluyen que estas diferencias podrían indicar una mayor habilidad de la utilización de la proteína en camarones pequeños (4 g) que en grandes (10 y 21 g). En otro estudio con *L. vannamei* que cubrió tamaños corporales desde 1 hasta 14 g, Hunter *et al.*, (1987) determinaron un incremento en la proporción C:N del material ingerido y observaron que el contenido de nitrógeno del material estomacal disminuyó a más de la mitad cuando los camarones incrementaron su peso de 5 a 7 g, posteriormente continuó un descenso hasta los 12 g. Los autores concluyen que este fenómeno puede implicar que los camarones seleccionan dietas con menos proteína en los estadios de vida más tardíos. Estas observaciones previas podrían estar relacionadas a la disminución de la actividad de las proteasas que se presentan en el experimento I. Una adaptación digestiva ante nuevas preferencias alimenticias podría estar ocurriendo porque aparentemente en los estadios de vida más tardíos, las enzimas digestivas de *L. vannamei* se ajustan a sustratos con menor contenido proteínico (disminución de la actividad de las proteasas) y con mayor contenido de carbohidratos y lípidos.

La disminución en el consumo de alimento artificial determinada a partir de los 8 g de peso en otros trabajos (Uribe y Posada, 1998; Molina y Piña, 1999) puede estar en relación directa a la disminución de la actividad de las enzimas proteasas y la tripsina, lo que podría representar una respuesta fisiológica ante el mayor consumo de material vegetal y de otros elementos de la productividad natural, y esto puede verse reflejado para los tratamientos del experimento II donde no se denota una diferencia en la actividad de la proteína total soluble, en la tripsina ni en la quimotripsina, mostrando así una adaptabilidad a todas las fuentes de alimento, ya sean de origen vegetal o animal marino.

Supervivencia

Como se ha observado en los resultados de supervivencia, ninguno de los tratamientos presenta diferencias ($p > 0.05$) en este parámetro poblacional, el cual presenta un alto

rendimiento, siendo siempre mayor de 95% para los 3 tratamientos del experimento I, en los cuales se usó una inclusión que correspondió al 30% de proteína en el alimento, el cual ha sido reportado por varios autores como el óptimo para juveniles de *L. vannamei* (Rosas *et al.*, 2000 b), con base a esta información se puede afirmar que el contenido en proteína bruta de los alimentos usados en el presente trabajo fueron adecuados para el buen desarrollo de los juveniles de *L. vannamei* (Cuzon y Guillaume, 1997).

En el experimento II los tratamientos con fuente de origen vegetal presentaron una tenencia por arriba de la dieta control en el valor de supervivencia, lo cual habla de la capacidad que tiene los organismos para adaptarse a este tipo de dietas. (Amaya *et al.*, 2007 y Álvarez *et al.*, 2007), pero al no presentar diferencias significativas se presupone que los 3 tratamientos tuvieron los requerimientos básicos para juveniles de *L. vannamei*.

La supervivencia y el crecimiento han sido considerados como un indicador de amplio espectro, debido a que refleja el efecto de las condiciones ambientales, incluido el alimento, sobre las respuestas fisiológicas de los organismos (Beamish *et al.*, 1975).

Coeficiente Diario de Crecimiento

Los resultados del experimento I, muestran al tratamiento D1 con valores más altos que los t. D2 y t. D3. lo cual corrobora trabajos anteriores (Tidwell *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 2004; Williams, 2004) quienes mencionan el gran potencial que tiene la soya en la sustitución en la elaboración de dietas para el camarón y su alta digestibilidad, las carencias que se pueden denotar para los tratamientos D2 y D3 también pueden relacionarse a la deficiencias en aminoácidos que presentaron las dietas (Cabanillas- Beltrán *et al.*, 2001); ya que en el caso del concentrado proteico de soya presentó el perfil de aminoácidos básicos más cercano al estimado para el tratamiento D6.

En el experimento II no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos D4 y D6. pero sí con el t. D5, el cual presentó un menor crecimiento, esto se puede atribuir a los FAN (Lemos *et al.*, 2001) los cuales se potencializaron al unir diferentes fuentes vegetales y presentar el efecto asociativo negativo (Brown *et al.*, 1989) negativo, además de corresponder directamente con lo observado en el análisis de CDA_{proteína}, la cual fue la más baja, por lo que se puede hacer una relación directa de la asimilación de la proteína con el crecimiento (Akiyama *et al.*, 1999), tomando en cuenta lo dicho por Rosas *et al.*, (2000 b) el cual señala que los camarones peneidos están estrechamente ligados al metabolismo de las

proteínas, ya que han demostrado una muy amplia capacidad para utilizar a este sustrato como fuente básica para la obtención de energía y el crecimiento, por lo tanto la diferencia en CDA_{proteína}, en los tratamientos pudo ocasionar la bajo peso en estos organismos.

Análisis de calidad del producto

La calidad del producto final, se ha vuelto una prioridad en la acuicultura, y en el caso del camarón es fundamental ya que su carne suele ser más blanda y con un sabor menos robusto que los organismos silvestres (Rivas-Vega *et al.*, 2001; Torres-Mendoza, 2003), estas características pueden ser afectadas por las dieta y por la calidad y cantidad de proteína en la dieta (Ezquerro *et al.*, 2003; Ezquerro *et al.*, 2004), y para poder estudiar esta característica se usó el colágeno ya que en productos marinos, el colágeno afecta significativamente la fuerza tensil, la integridad muscular y propiedades reológicas del músculo (Shahidi, 2006; Sikorski *et al.*, 1994).

El tejido conectivo está formado por diversas fibras embebidas en una sustancia fundamental, amorfa, gelatinosa y altamente hidratada, rica en proteoglicanos y glucoproteínas (Krane, 2003). Varios tipos diferentes de células están presentes en la sustancia fundamental e incluye fibroblastos (a partir de los que se sintetizan las proteínas fibrosas de colágeno y elastina), macrófagos y adipocitos (Varnam, 1998). La estabilidad estructural conferida por el tejido conectivo está determinada en gran medida por las propiedades de las fibras de colágeno, pues son quienes dan la firmeza necesaria para mantener unidas a las células, aunque la elastina también participa en menor grado, proporcionando la elasticidad requerida para el movimiento (Purslow, 2002; Styer *et al.*, 2002).

El colágeno es uno de los principales determinantes de la textura de carnes y productos marinos, además en estos últimos, también su concentración está relacionada con la capacidad natatoria de los organismos.

En este trabajo de investigación el colágeno fue aislado en los 6 tratamientos y presenta el mismo comportamiento reportado por Ezquerro *et al.*, (2004) donde el colágeno presenta pesos similares al del colágenos tipo I de bovino, pero a diferencia de lo reportado en el trabajo de Ezquerro *et al.*, (2004) no se presentó el incremento de las bandas en la dieta con proteína de calamar, cabe mencionar que esta posible falta de bandas es porqué el análisis

fue hecho solo en la parte obtenida por sales, debido a que en general, el colágeno de organismos acuáticos, es altamente soluble en soluciones salinas, ácidos diluidos y soluciones amortiguadoras ácidas, a diferencia del colágeno proveniente de mamíferos terrestres que son poco solubles en tales disolventes (Eckhoff *et al.*, 1998).

No obstante, la literatura reporta que este tipo de solventes son los que exhiben la menor capacidad para solubilizar colágeno puro (Miller y Rhodes, 1982), esto se explica por la alta fuerza iónica del medio, específicamente aquellas moléculas recién sintetizadas y que no están unidas dentro de las fibras mediante entrecruzamientos covalentes intermoleculares (Friess, 1998), pero también es capaz de solubilizar el resto de componentes miofibrilares que hayan quedado presentes después de su extracción con urea, por esto que la mayoría de los tejidos casi no presentan colágeno puro soluble en sal.

Es por lo anterior que se puede pensar que la falta de diferencias entre el patrón de bandeo se debe a la insolubilidad del colágeno la cual esta atribuida a la modificación de las fuerzas que mantienen unidas las moléculas de colágeno, principalmente puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas e hidrofóbicas, así como enlaces covalentes (Badii y Howell, 2003). La insolubilidad del colágeno también está relacionada con la edad del animal y su almacenamiento en congelación, debido a que durante este proceso, se promueve la remoción de agua entre las proteínas, favoreciendo la agregación proteica, producto del incremento en la superficie de contacto de las mismas (Morales *et al.*, 2000).

Con respecto a la textura y a la actividad de la colagenasa esta dependerá del músculo, el cual es responsable de los cambios en la apariencia, textura, sabor y propiedades funcionales (Haard, 1992).

Con respecto a la textura o la fuerza de penetración requerida para penetrar los diferentes músculos de los camarones, no se presentó diferencias significativa esto puede deberse a que su composición fue la misma, como lo muestran las patrones de bandeo, además de que todos tuvieron el mismo manejo post mortem y fueron evaluados al mismo tiempo, esto con respecto al manejo, y en cuestión de diferencias por la alimentación, tenemos que los organismo tuvieron una alimentación la cual contenía los amino ácidos necesarios para la formación del tejido, sin importar el tratamiento al que fueron sometidos, ya que las dietas eran isoproteicas.

8.- Conclusiones

Las fuentes seleccionadas para este experimento demostraron su gran capacidad para poder sustituir la fuente de origen animal al tener una digestibilidad de alto rendimiento en comparación de la dieta control que no es una dieta comercial si no una dieta óptima.

Con respecto a parámetros zootécnicos como es el de la supervivencia los 6 tratamientos tuvieron un rendimiento óptimo lo cual pone de manifiesto la calidad de las dietas, las cuales contienen todos los requerimientos mínimos para el mantenimiento de los organismos así dando una supervivencia por arriba del 90% en el experimento I y con una supervivencia del 86% para el experimento II.

En el rubro del crecimiento tenemos que la soya vuelve a reafirmar su gran potencial en la búsqueda de las nuevas fuentes proteicas, mientras que la papa y el trigo ponen a la vista el potencial que presenta para la nutrición en la acuicultura, y en el experimento II tenemos que el coctel aun cuando presenta niveles por debajo de la dieta control pone de manifiesto su potencial junto con la D. *Spirulina* para ser una fuente en la futura industria camaronera.

Capítulo 3. Experimento de crecimiento.

Postlarvas (D. Animal VS. D. Vegetal) y juveniles (D. Animal VS. D. Vegetal).

1.- Introducción.

Entender la digestión, requerimientos y respuesta a diferentes fuentes de proteínas, y el reparto de energía asociado a la alimentación, es relevante en el proceso de producción de camarones. La alimentación es un factor crucial pues se ha observado que los cambios en el peso y la talla están relacionados con características del alimento, como la concentración de proteína en la dieta (Ezquerro *et al.*, 2003). Además, se tiene que contemplar el estadio de los organismos pues durante el ciclo de vida de los peneidos existen cambios de morfología y fisiología con cambios de hábitos alimenticios de la herbivoría a la omnivoría. Estos cambios ontogénicos están acompañados de cambios significativos en las tasas metabólicas y en las actividades de las enzimas digestivas (Laubier-Bonichon *et al.*, 1977; Lovett y Felder, 1990; Chu y Ovsianico -Koulikowsky, 1994; Lemos *et al.*, 1999). El estudio del proceso de digestión y metabolismo de las proteínas es un tema de gran relevancia en diversas fases del proceso de producción de los camarones.

En el presente capítulo se tiene como objetivo, conocer el efecto sinérgico de la dieta vegetal mejorada (DVM) constituida a base de las fuentes de proteína dietética analizadas previamente, en factores tales como: crecimiento, supervivencia y el distribución bioenergética y en la expresión diferencial de la tripsina y quimotripsina de este crustáceo, desde la etapa de postlarva 15 hasta juveniles de 20 g.

La importancia de comprender la asimilación de los nutrientes de origen vegetal estudiados, es para poder reducir los costos elevados que representa la proteína de origen animal marino (Samocha *et al.*, 2004); Es por eso que este capítulo integra los conocimientos adquiridos sobre fuentes alternativas de proteína de origen vegetal, dando así origen a una dieta mejorada con proteína vegetal. Y así puede contribuir a una de las prioridades actuales de la acuicultura la cual es: facilitar la integración del conocimiento sobre asimilación de los nutrientes para esta especie que se comercializan, con el objetivo de comprender mejor los mecanismos que subyacen en los caracteres de importancia económica, como el crecimiento, la resistencia a enfermedades, y más recientemente a la calidad de la carne

(Alcivar-Warren, 1997; Davis y Hetzel, 2000; Pérez-Rostro, 2002; Robalino, 2004).

2.- Hipótesis.

Sí *L. vannamei* presenta una tendencia a la herbivoría en los estadios de postlarva y juvenil, no presentarán diferencias en factores tales como: crecimiento, supervivencia y reparto energético y en la actividad enzimática de tripsina, quimotripsina ante dietas con proteína de origen vegetal y origen animal marino.

3.- Objetivos.

Objetivos generales

Determinar el efecto de una dieta con proteína de origen vegetal en el crecimiento, supervivencia y la actividad de la tripsina y quimotripsina, así como la distribución de energía, en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*.

3.1.- Objetivos particulares del Experimento I.

Evaluar el efecto de la dieta vegetal mejorada, en crecimiento, supervivencia y distribución de energía en postlarvas pl 15 a pl 60 de *L. vannamei*.

Evaluar el efecto de la dieta vegetal mejorada, en la actividad de la tripsina y la quimotripsina del hepatopáncreas en postlarvas pl 15 a pl 60 de *L. vannamei*.

3.2.- Objetivos particulares del Experimento II.

Evaluar el efecto de la dieta vegetal mejorada, en crecimiento, supervivencia y distribución de energía en juveniles de 1.5 g hasta 20 g de *L. vannamei*.

Evaluar el efecto de la dieta vegetal mejorada, en la actividad de la tripsina y la quimotripsina del hepatopáncreas en juveniles de 1.5 g hasta 20 g de *L. vannamei*.

4.- Materiales y Métodos.

4.1.- Diseño experimental de ambos experimentos.

Para cumplir con los objetivos señalado se diseñaron 2 experimentos. El primero tiene como objetivo de estudio a las postlarvas de 15 días a 60 días, y el segundo fue la continuidad del experimento previo para así poder observar el efecto de la dieta a largo plazo hasta llegar a organismos de 20 g. Para poder realizar los bio-ensayos los organismos

se obtuvieron de reproductores de la UMDI Sisal, provenientes de un desove múltiple. Las condiciones de siembra fueron: temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con una salinidad de $35 \pm 0.5 \text{ ‰}$ y un oxígeno de $6.5 \pm 1 \text{ mg O}_2/\text{ml}$. La composición de la dieta fue en base al análisis de la proteína de origen vegetal de los dos capítulos anteriores, para así tomar e incluir los ingredientes de mayor digestibilidad y tener una respuesta óptima de la DVM.

El experimento I fue con pl 15 donde se incluyeron la dieta control con base en proteína de origen animal (DC) *vs* dieta vegetal mejorada (DVM), La duración del experimento fue de 30 días; Mientras que el experimento II fue la continuidad del experimento I de ambas dietas en juveniles tempranos (1.5 g.) a juveniles tardíos (20 g.), este bioensayo tuvo una duración de 105 días.

4.2.- Composición de las dietas.

En la Tabla 3.1 se presenta la composición de las dietas empleadas en los ambos experimentos, la composición de la dieta nos da un balance isocalóricos he isoproteicos.

Tabla 3.1. Composición de las dietas de los experimentos I. para postlarvas Experimento II. Para juveniles.

INGREDIENTES	DC	DVM
HARINA DE PESCADO	16	16
PASTA DE SOYA	15	10
HARINA DE TRIGO	14	8
CALAMAR	30	
CON. PROT DE SOYA		23
CON. PROT. DE PAPA		12
GLUTEN DE TRIGO		5
ACEITE DE BACALAO	5	5
LECITINA DE SOYA	2	2
COLESTEROL	0.5	0.5
ALMIDÓN	14.5	15.5
ROBIMIX C	0.03	0.03
VIT ROBIMIX	2	2
AGLUTINANTE	1	1
TOTAL	100	100

4.3.- Método de elaboración de las dietas experimentales.

Los ingredientes secos se tamizaron a menos de 250 mm y se mezclaron por 20 min y posteriormente se adicionaron los aceites, y se continuó el mezclado hasta formar la pasta, la cual fue pasada por un molino de robillo sin fin para extruirla y formar los pellets, el cual su secado a 45°C posteriormente los pellets fueron almacenados a 4°C hasta ser empleados.

4.4.- Descripción del dispositivo y condiciones de manejo de ambos experimentos.

La calidad del agua se mantuvo por medio de diferentes filtros, en el área externa se contó con un filtro de arena lecho profundo, filtro U. V. y un cartucho de 50 μ ; mientras que en el sistema de recirculación se tuvo un filtro de arena de lecho profundo, filtro de cartucho 20 m, un desproteinizador, además de contar con un “chiller” que mantuvo siempre la misma temperatura de 28 ± 1 °C.

El dispositivo en el cual se llevó el primer experimento fue con 30 tinas con capacidad de 30 L cada uno, el número de siembra fue de 30 postlarvas por cada tina y los parámetros fueron: salinidad de 36, una temperatura de 28 °C ± 1 y oxigenación a saturación; para mantener esta calidad de agua se hacían recambio del 30 % del agua a diario y se usó un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Para el segundo experimento se contó con 8 tanques de 1m de área de base, con un volumen de 400 L los cuales siempre mantuvieron una salinidad de 36, una temperatura de 28 °C ± 1 y oxigenación a saturación; para mantener esta calidad de agua se hacían recambio del 30% del agua a diario y se usó un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

4.5.-Ración Alimenticia para ambos experimentos.

La ración alimenticia se calculó cada 15 días, tomando el peso de 15 organismos por tratamiento y así hacer un promedio para, ajuntar la ración al 10% de su biomasa por estanque repartida en tres tiempos a alimentación.

4.6.- Parámetros a Evaluar en ambos experimentos.

4.6.1.-Indicadores fisiológicos.

Parámetros del balance Bioenergético.

El consumo de oxígeno se determinó al finalizar los experimentos usando organismos provenientes de cada uno de los tratamientos, para lo cual se usó un respirómetro de sistema abierto, utilizando 10 cámaras con capacidad de 500 ml o 1000ml según sea el peso de los organismos, en las cuales en 9 se les colocó 1 camarón, y se mantuvo una cámara control. Las determinaciones se realizaron por medio de las diferencias en las concentraciones de oxígeno en el agua de entrada y salida de las cámaras y conociendo la velocidad (constante promedio de 10 ml por 10 s) y temperatura (28 ± 1 C) (Rosas *et al.*,

2003).

$$VO_2 = \{([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}}) * \text{Flujo}\} - \{([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}})_{\text{control}} * \text{Flujo}_{\text{control}}\}$$

Dónde VO_2 es el consumo de oxígeno expresado en mg de O_2 por hora por animal, $[O_2]_{\text{entrada}}$ es la concentración en $mg L^{-1}$ de O_2 en el agua que entra a la cámara respirométrica, $[O_2]_{\text{salida}}$ es la concentración en mg por litro de O_2 en el agua sale de la cámara respirométrica, F es la velocidad o flujo del agua que pasa a través de la cámara respirométrica expresada en litros por hora.

Los valores de (UE+ZE) fueron estimados basados en la ecuación de Cho y Bureau, 1998 que corresponde al 0.9% de la sumatoria de la energía retenida en carcasa (RE)+(HiE)+energía basal (HeE).

$$UE+ ZE=(RE+HeE+HiE)*0.09.$$

Parámetros bioquímicos

Para la medición de las actividades de las enzimas digestivas, se obtuvieron los hepatopáncreas de los juveniles provenientes de los tratamientos, los cuales fueron pesados, para obtener el peso húmedo promedio y se almacenaron en micro tubos Ependorff posteriormente sumergidos en nitrógeno líquido ($-195^{\circ}C$) y almacenados a $-40^{\circ}C$ hasta el momento de su análisis.

Para preparar los extractos de los organismos se tomó el hepatopáncreas se les adicionó a cada micro-tubo 500 μ l de agua destilada y se homogeneizaron las muestras sobre hielo por 30 segundo con un “rotor” a velocidad máxima. Seguidamente se centrifugaron 20 min a 14 000 rpm a $4^{\circ}C$. El sobrenadante (extracto crudo) se separó por decantación el cuál fue en parte utilizado para medir la actividad enzimática de la tripsina y quimotripsina. Del mismo sobrenadante se tomaron 100 μ l y se diluyeron en 900 μ l de agua destilada obteniendo una dilución (1:10) y fueron utilizadas para medir la actividad de la α -amilasa, metabolitos y proteína total (Geiger, 1988), 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 fueron utilizados inmediatamente para su análisis.

Las determinaciones para la tripsina y quimotripsina de los hepatopáncreas se realizaron por los métodos de Geiger y Fritz, (1988) y Geiger, (1988), respectivamente. Los hepatopáncreas fueron homogenizados con 500 μ l de agua pura, centrifugados a 14 rpm a

4°C durante 20 min. La actividad de la tripsina se determinó usando BAPNA (benzoin-arginina-paranitro-anilide) (Sigma B7632) 100mM 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 Spectronic modelo 21D a 405 nm durante dos min, obteniéndose la diferencia en absorbancia entre el primer minuto y el segundo utilizándose un coeficiente de extinción $\epsilon_{405} = 1.02 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Geiger, 1988). Una unidad fue definida como la actividad correspondiente a 1 mM de p-nitroaniline liberado en un minuto. La actividad de la Quimotripsina fue medida por el mismo método pero con el sustrato succinil-alalina-2-prolina-phenil-p-nitro-anilida (SAPPNA)

Para la determinación de la proteína soluble (Bradford, 1976) mediante el kit Bio-Rad-500-0006. Se determinó la concentración de proteína soluble a través de la acción de una solución ácida de color, el azul de Coomasie, el cual se liga a los aminoácidos primariamente básicos y aromáticos, especialmente la arginina. Las muestras fueron leídas después de 10 min con un filtro de 595 nanómetros. Se colocó 10 mL del extracto crudo en un pozo de las microplacas por triplicado para cada muestra y posteriormente se añadieron 200 ml de la solución reactiva del kit, se dejó incubar 10 min y se leyó en un lector de la marca Biorad modelo 550 a 595 nm.

Electroforesis de la tripsina y quimotripsina.

El análisis electroforético de los extractos proteínicos obtenidos de los músculos de organismos en diferentes estadios de muda, se llevó a cabo bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Laemmli, (1970). Se trabajó con geles al 12 % Las muestras fueron mezcladas con azul de bromofenol (0.01%); Se tomaron alícuotas de 10 μl y fueron colocadas en el borde superior del gel. La electroforesis fue llevada a cabo con un voltaje constante (100 volts) hasta que la banda de colorante (azul de bromofenol) llegó a 1.0 cm del borde inferior del gel. La actividad de las proteínas fue obtenido por medio de la incubación del gel en caseína al 1% y después teñido con azul de Coomasie al 0.1% (en 40% de metanol/10% ácido acético) durante una hora y destiñendo con una solución 40% de metanol y 10% de ácido acético. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares de amplio rango.

Supervivencia

La supervivencia se calculó en base al número de organismos que llegaron al final del

experimento en relación con el número inicial de organismos. Los resultados se expresan en porcentaje.

Coefficiente Diario de Crecimiento

El crecimiento se determinó por medio del Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC) diario % mg día⁻¹.

$$\text{CDC} = (\text{Peso final}^{1/3} - \text{Peso inicial}^{1/3}) / \text{días} * 100$$

5.- Análisis estadísticos.

El diseño para el experimento I fue completamente aleatorio con 2 tratamientos y 15 réplicas/tratamiento, mientras que el segundo contó con 2 tratamientos y 3 réplicas. La densidad de siembra para experimento 1 fue de 30 organismos/tanque con un peso promedio de 0.012 ± 0.004 g. y para el experimento 2 fue de 50 organismos/tanque con un peso promedio de 6 ± 0.7 g.

Las pruebas para analizar los resultados en este capítulo para ambos experimentos fue una prueba de T (Zar, 1999), y se realizaron pruebas posteriori de Tukey. En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una probabilidad de 0.05.

6.- Resultados.

6.1.- Experimento I.

6.1.1 Indicadores Fisiológicos.

Balance energético

Los resultados del modelo de distribución bioenergética se presentan en la Tabla 3.2. Se realizó la prueba de T, para evaluar las diferencias entre de las dos dietas para todos los parámetros del modelo. En relación con respiración de rutina (HeE) no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$), Ni tampoco para el incremento de calor aparente (HiE),

En la Tabla 3.2 se presentan los valores en % de la Tabla 3.3, para así tener una presentación de los datos, donde se haga más fácil la observaciones las diferencias.

Tabla 3.2. Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día. del Experimento I (postlarvas).
Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

Tratamiento	Valor ED	HeE	HiE	UE + ZE	RE	EEXV
DC	1590.4 ± 134.9 ^a	448.0 ± 60.6 ^a	276.8 ± 64.5 ^a	126.8 ± 5.8 ^a	703.65 ± 86.4 ^a	35.2 ± 4.2 ^a
DVM	1727.8 ± 129.5 ^a	490.0 ± 44.5 ^a	392.1 ± 54.5 ^a	134.76 ± 8.3 ^a	677.1 ± 77.6 ^a	33.8 ± 3.9 ^a

ED (energía digerible calculada); HeE (energía de la respiración de rutina en ayuno; HiE (energía del incremento de calor aparente); UE (excreción amoniacal de ayuno); ZE (energía de excreción amoniacal post-alimentaria); RE (retención de energía para el crecimiento) EEXV (energía estimada por la muda)

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). Prom. ±Error estándar, n= 3.

Tabla 3.3. Modelo del balance bioenergético en %. del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

Tratamiento	Valor ED	HeE	HiE	UE + ZE	RE	EEXV
DC	100 ± 8.5	28.2 ± 3.8 ^a	17.4 ± 4.1 ^a	8.0 ± 0.4 ^a	44.2 ± 5.4 ^a	2.2 ± 0.3 ^a
DVM	100 ± 7.5	28.4 ± 2.6 ^a	22.7 ± 3.2 ^a	7.8 ± 0.5 ^a	39.2 ± 4.5 ^a	2.0 ± 0.2 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). Prom. ±Error estándar, n= 3.

Parámetros bioquímicos

Proteína soluble y la actividad específica de la tripsina y la quimotripsina de los hepatopáncreas de las postlarvas (pl) de *L. vannamei*.

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados de proteína soluble y de la actividad específica de la tripsina y la quimotripsina de las pl de *L. vannamei* del Experimento I. La proteína total soluble, resultó afectada por los tratamiento dietéticos, de tal manera que las pl alimentados con la DC presentaron el valor significativamente mayor, comparado con las pl

alimentadas con la DVM ($p>0.05$). Sin embargo, en lo que respecta a la actividad específica de la tripsina, el valor más elevado se presentó en los camarones alimentados con la dieta DMV ($p<0.05$). Por último, la actividad quimotripsina no resultó afectada por las dieta ($p>0.05$).

Tabla 3.4 Proteína soluble (mg/ml) y actividad específica (mU/mg de proteína) de la tripsina y la quimotripsina del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

Tratamiento	Proteína total soluble	Tripsina	Quimotripsina
DC	3.7 ± 1.5^a	3.5 ± 1.4^a	66.3 ± 4.3^a
DVM	3.5 ± 0.5^a	2.8 ± 0.7^a	39.4 ± 9.2^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). Prom. \pm Error estándar, $n=3$.

La desviación estándar más alta se encuentra en la actividad enzimática de la quimotripsina en las dos dietas, lo cual muestra su variabilidad ante las dos fuentes de proteína.

Supervivencia

En relación con la supervivencia (Fig. 3.1) no se observaron diferencias significativas entre las dietas probadas en el experimento ($p>0.05$).

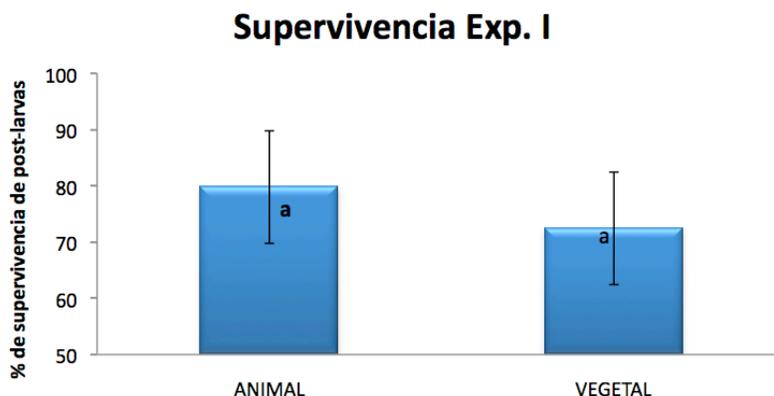


Figura 3.1.- Supervivencia (%) del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). Prom. \pm Error estándar.

Coefficiente Diario de Crecimiento

En relación con el crecimiento que los resultados de prueba de T no muestra diferencias ($p<0.05$). La tasa de crecimiento que presentó una tendencia a ser más elevada se obtuvo en los juveniles alimentados con la dieta animal, mientras que la dieta vegetal presentó el menor crecimiento (Figura 3.2).

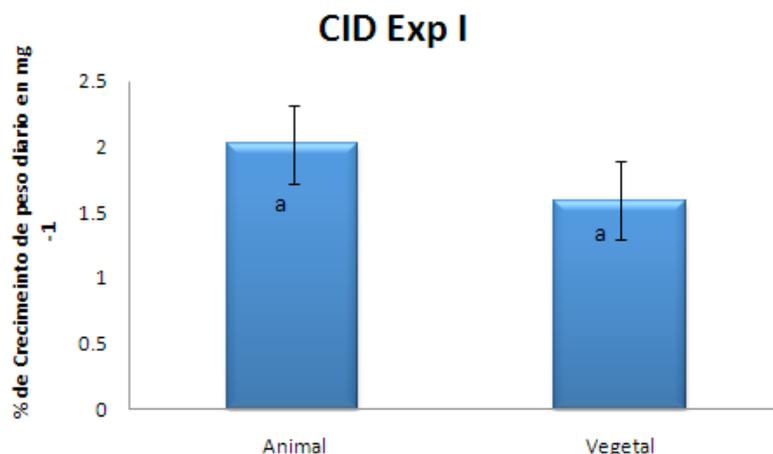


Figura 3.2. Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

La diferencia en ganancia de peso uno de los parámetros más representativos en el investigación pues es un factor muy relevante en la industria.

6.2.- Experimento II

6.2.1.- Indicadores Fisiológicos.

Balance energético

En la Tabla 3.5 se presentan los resultados del modelo de distribución bioenergética del experimento II DC, y DVM, donde se analizaron los valores de HeE, HiE con una prueba de T. La HeE más elevada se obtuvo en los juveniles alimentados con la DVM, (Tabla 3.5, $p < 0.05$), mientras que para la DC, no se observaron diferencias ($p > 0.05$). En relación con el HiE, la DC presentó el máximo valor, con representó a la DVM (Tabla 3.5, $p < 0.05$).

Tabla 3.5. Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día. del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

Tratamiento	Valor ED	HeE	HiE	UE + ZE	RE	EEXV
DC	2381.8 \pm 112.4 ^a	785.5 \pm 44.5 ^a	536.9 \pm 44.9 ^a	189.2 \pm 12.5 ^a	828.8 \pm 68.3 ^a	41.4 \pm 3.6 ^a
DVM	2177.7 \pm 98.5 ^b	934.0 \pm 94.4 ^b	429.0 \pm 94.5 ^a	168.6 \pm 9.0 ^a	615.3 \pm 82.8 ^b	30.8 \pm 3.9 ^a

ED (energía digerible calculada); HeE (energía de la respiración de rutina en ayuno); HiE (energía del incremento de calor aparente); UE (excreción amoniaca de ayuno); ZE (energía de excreción amoniaca post-alimentaria); RE (retención de energía para el crecimiento) EEXV (energía estimada para la muda)

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

En la Tabla 3.6 se presentan los valores en % de la Tabla 3.5, para así tener una presentación de los datos, donde se haga más fácil las observaciones de las diferencias.

Tabla 3.6. Modelo del balance bioenergético en % del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

Tratamiento	Dieta	Valor ED	HeE	HiE	UE + ZE	RE	EEXV
DC	Calamar	100 ± 4.7	33.0 ± 1.9 ^a	22.5 ± 1.9 ^a	7.9 ± 0.5 ^a	34.8 ± 1.6 ^a	1.7 ± 0.2 ^a
DVM	Vegetal	100 ± 4.5	42.9 ± 4.3 ^b	19.7 ± 4.3 ^a	7.7 ± 0.4 ^a	28.3 ± 2.9 ^b	1.4 ± 0.2 ^a

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ± Error estándar. N=3
Cabe resaltar que la desviación estándar más grandes son de nuevo en la DVM.

Parámetros bioquímicos

En la Tabla 3.7. se presentan los resultados de la proteína soluble y las actividades específicas de la tripsina y la quimotripsina de los juveniles alimentados con las dos dietas. La prueba de t no detectó diferencias significativas ($p > 0.05$) ni en relación con la proteína soluble, ni para las 2 enzimas analizadas (Tabla 3.6).

Tabla 3.7. Proteína total soluble (mg/ml) y actividad específica de la tripsina (mU/mg de proteína) y la quimotripsina (mU/mg de proteína) del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

Tratamiento	Dieta	Proteína	Tripsina	Quimotripsina
DC	Calamar	1,8 ± 0.1 ^a	31.5 ± 10.3 ^a	451.0 ± 91.5 ^a
DVM	Vegetal	1.9 ± 0.6 ^a	24.3 ± 3.7 ^a	190.1 ± 41.0 ^b

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. ± Error estándar. N=3

La desviación estándar presente en la quimotripsina vuelve a ser más alta, teniendo el mismo comportamiento que en el experimento I, al igual que la proteína presenta los valores más bajos de desviación estándar y la tripsina teniendo valores intermedios.

Supervivencia

La prueba de T aplicado al porcentaje de supervivencia presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) (Fig. 3.3), siendo la DC la que presenta un mejor rendimiento en este rubro, y la DMV el valor más bajo.

Coefficiente Diario de Crecimiento

El coeficiente diario de crecimiento (CDC, % día⁻¹), no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Presentó una tendencia en crecimiento, siendo la DC la más elevada, mientras que el valor menor se presentó en la DVM ($p > 0.05$) (Figura 3.4)

El crecimiento es uno de los parámetros más importantes para la industria acuícola por lo

que al tener una respuesta positiva con las fuentes de origen vegetal surgiere su gran potencial para sustituir la proteína de origen animal.

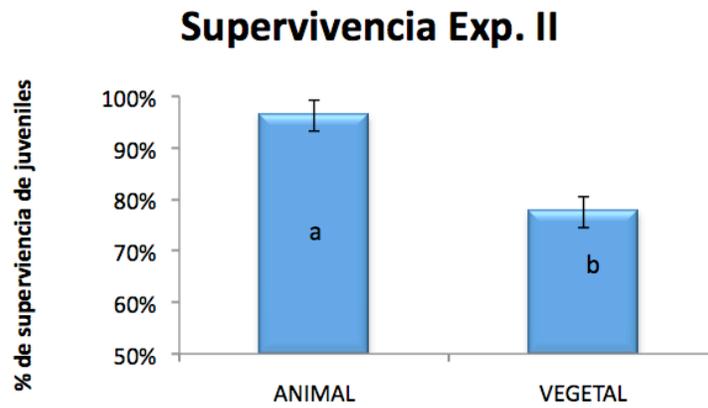


Fig. 3.3.- Supervivencia (%) del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal). *Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

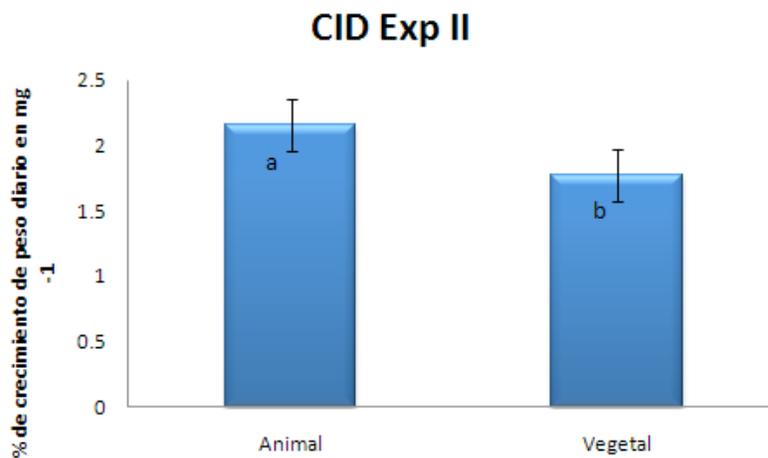


Figura 3.4.- Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) DVM (vegetal).

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Prom. \pm Error estándar.

7.- Discusión

Indicadores Fisiológicos

Anger, (2001) menciona que el crecimiento y desarrollo implica las conversiones en energía química potencial, originada del alimento ingerido o bien de las reservas internamente almacenadas. Estos procesos de conversión son sintetizados en términos metabólicos, y debido al metabolismo intermediario de los crustáceos, depende del consumo de oxígeno (comúnmente referido como respiración) y altamente correlacionada con la tasa metabólica global.

La respiración tanto en pl como juveniles es continuamente afectada por la calidad y cantidad de alimento disponible en el medio, en términos generales se ha propuesto que la alimentación incrementa la tasa respiratoria y su efecto ha sido denominado Acción Dinámica Específica (Lehninger *et al.*, 1993) o Incremento de Calor Aparente (Rosas *et al.*, 1997 a) y representa los costos energéticos de la alimentación y la digestión.

Es por esto que hay tener muy presente la calidad y cantidad de las fuentes vegetales usadas en esta investigación las cuales son de gran valor nutritivo y tiene un impacto en factores fisiológicos y bioquímicos refiriéndonos a la actividad de las enzimas involucradas en la asimilación de los nutrientes.

En el caso de las pl presentan un comportamiento omnívoro con tendencias a la herbivoría y pueden alimentarse de fuentes de origen vegetal y animal en su ciclo de vida (Anderes, 1982; Anderes, 1984; Marte, 1980; Hunter y Feller, 1987), lo cual indica que estos organismos presentan una gran diversidad de enzimas digestivas capaces de digerir estas fuentes proteicas (Lovett y Felder, 1990), y es en esta etapa donde la formación de hábitos alimenticios está en un constante cambio, siendo los pendidos un grupo que se adaptan muy bien a los cambios en la composición de la dieta mediante la inducción de un conjunto de enzimas digestivas (Le Moullac *et al.*, 1996), además de que *L. vannamei* presenta una tolerancia nutricional mayor que otras especies. Esta tolerancia se debe, en parte a su alta capacidad para utilizar un amplio rango de proporciones proteína/energía para su crecimiento (Rosas *et al.*, 2001).

Sin embargo la diferencia de crecimiento y supervivencia que se pudo observar en la etapa de juveniles se puede deber a lo observado por Rosas *et al.*, (2000) donde las diferencias en

los hábitos alimenticios y en los requerimientos nutricionales están asociadas también con la capacidad de las especies para utilizar en diferentes proporciones a las proteínas como sustrato metabólico, siendo la dieta de calamar la que proporcionada mejores fuentes en el estadio de juvenil, lo cual está de acuerdo con Nunes *et al.*, (1996) que determinó que los camarones ingieren una gran variedad de componentes que varían en proporción a diferentes edades, y siendo esta etapa donde se presenta un mayor afinidad por la proteína de origen animal.

Los resultados de este estudio manifiestan la habilidad de *L. vannamei* para consumir las fuentes de proteína de origen vegetal en cantidades superiores a una fuente de proteica de origen animal marino, en la etapa de pl, lo cual confirma lo expresado por Anderes, (1982 y 1984) al considerar a esta especie como omnívora con tendencia a la herbívora en esta etapa y omnívora con tendencias a las fuentes de proteína animal en la etapa juvenil.

Experimento I

Balance energético,

En el caso del balance energético en las pl no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados, solo una tendencia a ser más alta la energía de retención (RE) en los organismos alimentados con la dieta de origen animal marino, y una mayor facilidad para asimilar este ingrediente, esto se vio reflejado en el valor bajo que presentó el valor de energía del incremento de calor aparente (HiE) a comparación de los organismos alimentados con la dieta vegetal, esto se puede atribuir a que la en la fase terminal del estadio de pl ya se presenta una tendencia al uso de proteína de origen animal marino, y esta se acentúa en la etapa juvenil.

Supervivencia y Coeficiente Diario de Crecimiento

Las pl alimentadas con la dieta de origen vegetal, presentan crecimiento y supervivencia sin diferencias significativas con la dieta control, lo cual corresponde positivamente al balance bioenergético, esto se debe a varias razones:

La dieta vegetal mejorada está compuesta por concentrados proteicos de alta calidad y un alto nivel de digestibilidad (Lemos *et al.*, 2009, Capítulo 1 y 2). Sé confirma en buena medida la calidad nutricional de los diferentes ingrediente usados (Carrillo, 1994; Lemos *et al.*, 2009), además estos ingredientes presentan una digestibilidad comparable a la harina

de pescado (Anexo A).

Otra razón es que al producirse una mezcla complementaria de nutrientes, generalmente se obtiene mejores resultados que cuando se emplea un sola fuente proteica de origen vegetal (Jaime, 2006).

A favor de estos ingredientes tenemos los resultados logrados por Forrellat *et al.*, (1988) y Gallardo *et al.*, (1989) que evaluaron algunos ingredientes proteicos y obtuvieron que la harina de pescado cubre casi de manera satisfactoria los requerimientos de *L. vannamei* refiriéndose a los aminoácidos esenciales (a.a.e.), sin embargo la combinación de diferentes ingredientes de origen vegetal y animal marino logró satisfacer de manera completa las necesidades de a.a.e. (Anexo A), en el caso de los organismos alimentados con la dieta vegetal presentaron los mismo resultados que los organismos alimentados con la dieta control en la etapa de pl, siendo nula la diferencia significativa en valores de zootecnia.

El aporte de los diferentes ingredientes tiene un desempeño fundamental, en el caso de la soya la cual posee una composición proteica de alta calidad nutricional, probablemente la mejor de las leguminosas. (Anexo A). Los niveles inclusión de la soya en los alimentos comerciales para camarones por lo general se encuentran entre el 10 y el 25%; el nivel máximo no debe exceder el 40% (Akiyama *et al.*, 1989), en el caso de este estudio se usó solo el 23 % de concentrado proteico y 10 % harina de soya lo cual está dentro de los parámetros de mejor rendimiento, además se tiene que valorar el uso del concentrado proteico en vez de la harina (Anexo A).

Otra factor para que no se presentaran diferencias entro las pl es el uso de la harina de papa que es un excelente componente proteico para el cultivo de animales marinos (crustáceos y peces) (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000, 2000 a y 2000 b).

Su contenido de proteína supera los niveles de proteína de origen animal, debido a ello puede reemplazar la fuente de proteína en la alimentación de los camarones, además el perfil de los aminoácidos no está solamente bien balanceado, sino que el contenido de aminoácidos es de alto valor en todos los a.a.e. (Anexo A). Esto particularmente aplica a lisina, metionina, treonina y triptofano; Además la harina de papa es rica en fósforo; esta contiene tres veces más fósforo que calcio (Anexo A) (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000, 2000 a y 2000 b).

El otro ingrediente de la dieta vegetal mejorada es el trigo el cual tiene un porcentaje de

proteína medio, con algunos a.a.e. limitante como son la lisina, treonina y valina (Anexo A); Pero la materia seca es relativamente baja, lo cual ayuda a la buena asimilación de dicho ingrediente. (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000, 2000 a y 2000 b).

Además en esta dieta se usó el gluten de trigo el cual contiene entre un 80–85 % total de las proteínas del trigo (Shewry y Halford, 2002; Shewry, Napier, y Tatham, 1995), es por esto el uso de esta forma del ingrediente para poder ayudar y aportar los requerimientos necesarios para *L. vannamei* y así lograr los buenos rendimientos en crecimiento y sobrevivencia que se presentaron en la etapa de pl alimentadas con la dieta vegetal mejorada.

En el caso de los organismos alimentados con la dieta compuesta por harina de calamar presentan un buen desempeño, con una tendencia al mejor crecimiento y supervivencia, lo cual puede ser atribuido a que esta fuente cuenta con factores de crecimiento (Ezquerro *et al.*, 2004), otro factor es que las pl al final de esta etapa ya presentan una tendencia a buscar fuentes proteicas de origen animal (Kanazawa *et al.*, 1985), además de que presentan una gran palatabilidad ante este insumo (Cruz-Suárez *et al.*, 2001), al igual que la harina de pescado (Anderson *et al.*, 1993)

Se debe contemplar que la digestibilidad que presenta esta fuente de proteína es de alto rendimiento lo cual puede incrementar el crecimiento y supervivencia de las pl, debido al menor gasto energético para hidrolizar proteínas (Álvarez, 2003), lo anterior se ve reflejado en balance bioenergético de dichos organismos, teniendo un menor gasto energético en el consumo de esta dieta.

Las características expuestas en el párrafo anterior nos muestran las bondades del calamar y se ve un posible impacto al final del experimento siendo la dieta vegetal la de menor supervivencia y menor crecimiento en la etapa pl la cual se hace notoria en la etapa juvenil donde se ven diferencias significativas.

Experimento II

Balance energético,

En el estadio de juveniles se encontraron diferencias significativas en parámetros importantes como son la RE y ED; Los animales alimentados con la dieta control, son los que presentan un valor más alto de ED y esto se debe a que la dieta cuenta con diferentes

factores que ayudan a hacerla más consumida, y por ende proporcionar mayor cantidad de energía a los organismos (Gaxiola *et al.*, 2005).

Los factores que ayudan a ser la más ingerida es que presentan un mayor palatabilidad, además de que estudios donde se concentran relaciones de diferentes fuentes de origen animal marino proporcionan un mayor crecimiento como es el caso de trucha donde la dieta con solo calamar proporcionada un buena tasa de crecimiento pero si se incluye harina de pescado mejorada la tasa de ingestión y crecimiento (Cruz-Suárez *et al.*, 2001).

Además la fuentes presentan un impacto positivo en la RE y esto se debe a que la fuente presenta un factor de crecimiento (Ezquerro *et al.*, 2003), es este esto se ver reflejado en la tasa de crecimiento mayor y mejor supervivencia en experimento II en la etapa de juveniles Estas diferencias en el balance energético, se pueden ver reflejadas en los indicadores de crecimiento y supervivencia.

Supervivencia y Coeficiente Diario de Crecimiento

Las diferencias presentadas por los juveniles de *L. vannamei* puede deberse a un efecto acumulativo de las carencias mínimas negativas presentadas desde su crianza, como se sabe en el cultivo de camarón, la larvicultura tiene un papel fundamental en la supervivencia y crecimiento en todo el desarrollo del cultivo (Jaime, 2006).

De hecho se puede plantear, en concordancia con Lovett y Felder, (1990), que el cambio de función intestinal que se opera en las pl de camarones peneidos, que incluye diferencias en la velocidad de tránsito del alimento por el tracto digestivo, puede ser el origen de la diferencia en el requerimiento proteico entre pl y juveniles de la misma especie.

Lovett y Felder, (1990) afirman que en el caso de pl tempranas de peneidos, cuando se provee de un aporte continuo de alimento, se produce un desperdicio del mismo debido a que es pasado directamente al tronco del intestino medio y eliminado en forma de heces, pudiendo darse una asimilación neta menor en un periodo determinado de tiempo. Pero este transitó rápido del bolo alimenticio puede favorecer el movimiento de los FAN de las fuentes vegetales y hacer menos evidentes los efectos de estos, ya que al ser tan rápido el movimiento intestinal los inhibidores de las proteasas no afectan a las pl de la misma manera que a los juveniles (Leterme y Beckers, 1989). En comparación de los juveniles donde el aparato digestivo en su forma adulta permite que ingieran únicamente lo que asimilan efectivamente y la alimentación cesa cuando la cámara cardíaca se ha llenado,

permitiendo así la acción de los FAN presentes en la dieta de origen vegetal.

Este tipo de características a llevado a que un número de investigaciones presenten un gran interés acerca de los procesos digestivos y se enfoquen en la evaluación de las habilidad de los organismos para hidrolizar, absorber y asimilar los principales nutrientes de la dieta (Guzmán *et al.*, 2001) en diferentes etapas del desarrollo pues una alimentación efectiva depende del conocimiento acerca de cómo los organismos usan los diferentes componentes de las dietas (Vega-Villasante *et al.*, 2004)

Uno de los factores más importantes a evaluar son los FAN presentes en los insumos utilizados para formular la dieta de origen vegetal, estos FAN son los posibles causantes del bajo crecimiento y supervivencia en los organismos alimentados con esta dieta en la etapa juvenil.

Tenemos que en la soya el inhibidor de a-amilasa de tipo knottin (Franco *et al.*, 2002); Peláez *et al.*, (1991) encontraron otros FAN como oxalatos y nitratos; En el trigo Fitohemaglutininas, ácido fítico, factor flatulento, inhibidor de amilasa y posible contaminación con aflatoxinas. (Tacon, 1989); Y en la Papa como FAN tenemos la solanina (Anexo A). Además de los mencionado en el capítulo 1 y 2 para cada uno de los insumos.

Para poder entender mejor el efecto de estos factores tendremos que ver el efecto que tiene sobre las enzimas.

Indicadores Bioquímicos

Experimento I y II

Los estadios larvarios y postlarvarios de los camarones peneidos sufren una serie de cambios metamórficos que inciden directamente sobre la actividad enzimática (Lovett y Felder 1990; Lemos y Rodríguez, 1998). Sin embargo, también en las etapas de juvenil y adulto se detectan cambios en las diferentes actividades enzimáticas que parecen estar relacionados al crecimiento y a la digestibilidad del alimento (Lee y Lawrence, 1985; Gamboa *et al.*, 2003).

Una correlación entre el cambio ontogenético en la actividad enzimática y la variación en el patrón alimenticio en camarones peneidos ha sido ampliamente aceptada (Lee *et al.*, 1980; Fang y Lee 1992; Ribeiro y Jones, 2000). La importancia de conocer la variabilidad de la

actividad enzimática relacionada con el proceso ontogenético radica en el hecho de que ésta relación se puede usar como un índice del estado trófico para estimar la fase de desarrollo en las cuales las formulaciones de las dietas deben ser modificadas (Cuzon *et al.*, 2003; Galgani *et al.*, 1984).

Es por lo anterior que podemos ver diferencias en la actividad de las enzimas en los juveniles las cuales no se veían en las pl las cuales tiene una mayor adaptabilidad a diferentes fuentes nutricionales. Ha sido hipotetizado que la actividad enzimática es más alta en aquellos subsatratos que son más comunes en la dieta (Johnston y Yellowlees 1998; Moss *et al.*, 2001), lo cual corresponde a la mayor actividad de la quimotripsina en los hepatopáncreas de los juveniles alimentados con la dieta animal, esto puede ser una adaptación de *L. vannamei* pues cambia sus hábitos alimenticios en este estadio, siendo su base de alimentación fuentes proteicas de origen animal (Rosas *et al.*, 2000).

Por otro lado las deficiencias provocadas por la dieta vegetal puede tener varias razones una de ellas es que la cantidad de fibra, lo cual puede provocar un aumento de la velocidad de tránsito del bolo alimenticio, no permitiendo actuar a las enzimas digestivas el tiempo suficiente para asimilar los nutrientes. (Alvarez *et al.*, 2004), pero si para dejar los actuar a los FAN de estas fuentes.

Otro son los FAN, mencionados ya en los capítulos anteriores (Anexo A).

Es un hecho ampliamente reconocido que las fuentes vegetales contienen una variedad de FAN que inciden o interfieren en la disponibilidad de los nutrientes, causando un efecto negativo en el crecimiento de los animales. La concentración de estos factores es muy variable y sus efectos biológicos son distintos según la especie animal (Huisman *et al.*, 1991), siendo los animales jóvenes más sensibles a ellos, es por esto que se pueden ver las diferencias en esta etapa.

Inhibidores de las proteasas

Los inhibidores de las proteasas son proteínas con actividad específica antitripsínica y antiquimotripsínica (Griffiths, 1984). Aunque existe una gran variabilidad entre los distintos fuentes, el efecto general de estos inhibidores de las proteasas es el de reducir la digestibilidad de las proteínas e incrementar las secreciones digestivas de las enzimas. Estos efectos se producen mediante la formación de un complejo estable (enzima-inhibidor) que transita a lo largo del tracto digestivo sin ser atacado, aumentando las pérdidas de

material endógeno (Leterme y Beckers, 1989), en el caso de los dos estadios no se puede ver este efecto, pues son los animales alimentados con la DC, los que presentan una mayor actividad en las enzimas tanto tripsina como en la quimotripsina, lo cual concuerda con lo dicho por otros autores, que menciona que la actividad enzimática digestiva es alta para aquellos sustratos que son más comunes en la dieta (Cox, 1981; Johnston y Yellowlees, 1998), además de que la calidad y fuente de proteína puede afectar la actividad de una enzima mediante la regulación de la síntesis, secreción e inactivación (Snook y Meyer, 1964).

Taninos

Los taninos son un grupo de compuestos fenólicos (polifenoles) que poseen la capacidad de formar complejos con los nutrientes de la ración, primordialmente la proteína, haciéndolos resistentes a la acción de los enzimas digestivos (Griffiths, 1981). Pueden también, por sí mismos, inactivar estas enzimas (Longstaff y McNab, 1991), y esto se ve reflejado en su baja actividad de las enzimas tomadas del hepatopáncreas de los organismos alimentados con la dieta de origen vegetal tanto en etapas de pl y juveniles

Los taninos son generalmente bastante resistentes al calor, es por esto que es difícil eliminar por completo este FAN, pero hay otras alternativas, que se tendrán que usar, y estudiar el efecto de dichas técnicas por ejemplo en el caso particular de las leguminosas, estos compuestos son predominantemente taninos o polifenoles condensados que se encuentran localizados en la cascarilla de las semillas pero el descascarillado es el mejor proceso para eliminar estos factores ya que se encuentran presentes en la cascarilla. El remojo en soluciones acuosas y alcalinas solubiliza y modifica los taninos (Chavan *et al.*, 1979). El almacenamiento anaerobio y la adición de productos químicos (polivinilpirrolidona y polietilenglicol) pueden también reducir los efectos nocivos de estos FAN (Mitaru *et al.*, 1985; Salunkhe *et al.*, 1990).

Lectinas

Son glicoproteínas capaces de unirse a azúcares específicos y a otras glicoproteínas.

La mayoría de las lectinas son resistentes a la hidrólisis causada por los enzimas digestivos proteolíticos, y son eliminadas con las heces (Jaffe, 1980; Nakata y Kimura, 1985). Debido a esta resistencia, las lectinas permanecen activas en el intestino y son capaces de unirse a los receptores localizados en la superficie del epitelio intestinal, es por eso que el efecto de

estos no son tan intensos en el caso de las pl las cuales tiene un transitó digestivo rápido, y por eso la falta de diferencias en los indicadores fisiológicos, pero no así en los organismos en estadio juvenil alimentados con la dieta de origen vegetal, la cual si presenta un impacto negativo, que se ve reflejado en los indicadores fisiológicos.

Al igual que los inhibidores de las proteasas, las lectinas son inactivadas por el tratamiento térmico dependiendo su inactivación de la temperatura alcanzada. Estudios en ratas y pollos han demostrado que estas glicoproteínas se unen fuertemente a las membranas de los enterocitos, pudiendo afectar el proceso de absorción de los nutrientes (Pusztai, 1989; Rubio *et al.*, 1990). Por otra parte, se ha comprobado que las lectinas pueden competir con los microorganismos en los mismos lugares de la pared intestinal, produciendo un desequilibrio en la microflora intestinal y favoreciendo la formación de cepas bacterianas patógenas (Sissons, 1989). Las lectinas se caracterizan por su gran riqueza en cistina, y en su estructura se encuentran puentes disulfuros que las hace inatacables por las enzimas digestivas.

La aplicación de los tratamientos térmicos a las leguminosas tiene un efecto muy directo sobre su digestibilidad nutritiva y esto, a su vez, influye marcadamente en el crecimiento de los animales. Por lo tanto, la determinación de la actividad de los FAN no puede ser tomada como único indicador de la eficacia del tratamiento térmico cuando éste se relaciona con el valor nutritivo. Los datos recogidos por King *et al.*, (1983), Myer y Froseth, (1983), Rodriguez y Bayley, (1987) y Van der Poel, (1990), reflejan la necesidad de una mayor información en relación con la contribución relativa de cada uno de los FAN y el efecto del tratamiento térmico sobre la digestibilidad ideal de los nutrientes, especialmente proteína, en distintas especies.

Conclusiones

En el proceso para substituir la proteína de origen animal marina por otras fuentes de proteicas y en particular con fuentes de origen vegetal, se ha puesto de manifiesto una tendencia reciente y a dado origen a propuesta de nuevos estudios en el camarón.

El camarón ha sido alimentado con diferentes fuentes de origen vegetal, tal como los granos de soya la cual se tiene conocimiento de su alta digestibilidad además de presentar un precio bajo y una gran disponibilidad, sin embargo una de las desventajas más notables son sus FAN del grano de soya (SBM) tales como su factor anti-tripsina. Es por esto el interés en los concentrados proteicos de soya para la formulación de dietas, en donde se elimina el factor anti-tripsina, aunque se puede acumular residuos de fitasas, El costo de los concentrados proteicos pueden ser más alto, pero también el nivel de inclusión es las dietas es menor.

Los concentrados proteico de origen vegetal estudiados en este trabajo fueron encontrados como factibles para la sustitución de la harina de pescado debido a su alta digestibilidad, la cual está por encima de alimentos regulares y por presentar un buen balance en términos de suministro de aminoácidos esenciales, sí se pone en comparación con alimentos comerciales incluyendo las dieta elaborada con calamar y harina de pescado.

En términos prácticos la posibilidad de usar dichas dietas tiene dos puntos a contemplar:

Los cuales son el nivel de inclusión de la proteína y el sistema de cultivo a usar; Por ejemplo, en caso de una densidad media baja la necesidad de la dieta para las exigencias reales de *L. vannamei* es una combinación de concentrado proteico de soya, trigo y concentrado proteico de papa con calamar y harina de pescado en un porcentaje del 25 al 30 %, como se ha mostrado en varios experimentos anteriores. Pero estos resultados se mejoraran sí se usa un sistema intensivo con “Floc” y un alimento con una inclusión al 20 % de proteína; En dicho caso la combinación de concentrado de origen vegetal (El trigo, la soya y papa) podría ser usados necesitando solo el 2 % de calamar para este tipo de sistemas intensivos de camarón blanco.

Tal acercamiento será experimentado en el futuro debido a nuevas demandas sobre la disponibilidad de tierra costera y una tendencia dramática para reducir los desechos de los sistemas de producción de animal, además de la urgencia para reducir el contenido de proteína en la alimentación de camarón, junto con una búsqueda constante para la mejora

del funcionamiento total económico y una necesidad urgente de una conversión de alimento inferior, comparada a lo que existe ya en el campo de piscicultura.

Conclusiones y Recomendaciones Generales

Después de analizar el uso de fuentes alternas de proteínas vegetales como sustituto de la harina de calamar en dietas para camarón se puede concluir:

De las plantas oleaginosas, las más utilizadas actualmente de forma importante en la alimentación acuícola es la harina de soya a pesar de su diferencia en algunos aminoácidos y contenido de FAN, es la fuente de proteína vegetal más usada en la acuicultura, llegándose a utilizar como recurso proteico hasta el 100% en algunas especies.

Sin embargo, tiene la enorme desventaja de que su uso compite con el consumo humano y animales terrestres, lo que ha elevado los costos y en algunos países es tan cara o inaccesible como la harina de calamar.

Otro punto importante a desarrollar es el uso de esta fuente y su impacto en los consumidores, pues falta todo el análisis del impacto en la salud por usar estos nuevos ingredientes, como es el concentrado proteico de soya.

La utilización de las micro algas en dietas balanceadas para larvas de camarón *L. vannamei* está recobrando importancia (Freeman *et al.*, 1996). *Spirulina* sp. se ha incorporado como un constituyente importante y como complemento alimenticio en las dietas de larvas de peces, principalmente debido a su riqueza en proteínas, vitaminas, carotenos y ácidos grasos. Pero generalmente altos niveles de inclusión en las dietas limitan el crecimiento debido a su elevado contenido de ácidos nucleicos y deficiencias de aminoácidos sulfurados.

Las leguminosas tienen un gran potencial para su uso en acuicultura como sustituto parcial de la harina de calamar, por los altos niveles de proteína que tienen, porque en su cultivo no requieren fertilizantes nitrogenados y por la amplia variedad de especies que existen.

Se considera necesario continuar con esfuerzos de investigación para identificar especies o variedades con bajos valores de FAN como los realizados con la canola. Es importante también realizar estudios sobre técnicas efectivas y de bajo costo, para la eliminación de ciertos FAN y estudios agronómicos para incrementar la producción de las plantas seleccionadas, con el fin de conocer el potencial de las mismas a nivel comercial.

Se ha probado que las leguminosas son vehículos adecuados en sistemas de extrusión en

donde se mezclan con subproductos de origen animal, obteniendo mezclas proteicas de alta calidad.

Un estudio importante será la fuentes de proteína vegetal locales, pues la utilización de estos subproductos se realiza solamente en las regiones en las que se encuentran disponibles. Algunos de estos concentrados proteicos no pueden ser utilizados debido a los niveles y toxicidades de algunos FAN como la solanina en el caso de la papa.

Existen nuevas áreas de investigación de producción proteica masiva, en la utilización de plantas halófitas como fuentes alternas, que puedan integrarse a los sistemas de cultivo semi intensivo e intensivo comercial y alternativos como el bio-floc en peces, crustáceos marinos y de aguas salobres, utilizando los efluentes cargados de nutrientes, transformándolos en proteínas, aceites y carbohidratos para consumo humano y animal.

ANEXO A

En este Anexo se compone de varias tablas donde se resumen las características de los ingredientes estudiados en esta tesis y la información que se utilizó para poder explicar los efectos de estas fuentes proteicas sobre nutrición en *L. vannamei*.

Tabla Resumen de la Harina de Calamar, Harina de Pescado, Concentrado Proteico de Soya, Gluten de Trigo y Concentrado Proteico de Papá

Harina de Calamar				
Características	Cualitativo	Cuantitativo	Autores	Comentario
% Proteína	+++	95%	Martínez-Vega <i>et al.</i> , 2000b	
% Proteína Cruda	+++	80%	Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000	
Materia seca		95%	Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000	
a.a. Limitantes		fenilalanina	Kreuzer, 1986	Todos son óptimos
Palatabilidad	+++	positiva	Ezquerria <i>et al.</i> , 2003	Se usa en la industria con este fin
Digestibilidad in vivo	casi en un 100%,	75 -88 %	Córdova-Murueta y García-Carreño <i>et al.</i> , 2002	Menciona que es digestibilidad aparente y % de hidrólisis
Digestibilidad in vitro		40 - 60 %		
Digestibilidad proteína		83%		
Digestibilidad m.c.		69%		
Digestibilidad energía		80%		
Factores antinutricionales	No existen			
Factor de crecimiento	+++		(Córdova-Murueta y García-Carreño, 2001; 2002; Ezquerria <i>et al.</i> , 2003	
uso en la acuicultura		(peces y crustáceos)	(Hardy, 2006).	En las ultimas dos décadas el uso ingrediente para alimento se ha incrementado notablemente
Uso en la camaricultura	+++		Cruz-Ricque <i>et al.</i> , 1987	Efecto estimulante para peneidos.
Nivel de inclusión		5 - 60 %	Ezquerria-Brauer <i>et al.</i> , 2003, Cruz-Ricque <i>et al.</i> , 1987, Díaz <i>et al.</i> , 1999	Depende de la etapa y tipo de especie de camarón.

Harina de Pescado				
Características	Cualitativo	Cuantitativo	Autores	Comentario
% Proteína	+++	60 - 95 %	Anderson <i>et al.</i> , 1993 Hardy y Masumoto 1991	
% Proteína Cruda	+++	61 - 85 %	Aizpún <i>et al.</i> , 1968 Anderson <i>et al.</i> , 1993	
Materia seca				
a.a. Limitantes		fenilalanina	Kreuzer, 1986	Todos son óptimos
Palatabilidad	+++	Muy Positiva	Varios	Es una de las fuentes que se usa para poder darle palatabilidad a las dietas.
Digestibilidad in vivo	casi en un 100%,	75.1-88.6 %	Córdova-Murueta y García-Carreño <i>et al.</i> , 2002	Menciona que es digestibilidad aparente y % de hidrólisis
Digestibilidad in vitro	15 - 46 %			
Digestibilidad proteína		80%	Smith <i>et al.</i> , 2000	
Digestibilidad m.c.		93%	Smith <i>et al.</i> , 2000	
Digestibilidad energía		89%	Smith <i>et al.</i> , 2000	
Factores antinutricionales	No existen			
Factor de crecimiento	+++			Por su alta palatabilidad
uso en la acuicultura	+++	(peces y crustáceos)	(Hardy, 2006).	En las ultimas dos décadas el uso se ha incrementado notablemente
Uso en la camaricultura	+++		Cruz-Ricque <i>et al.</i> , 1987	
Nivel de inclusión	+++	5 - 48 %	Allen Davis y Arnold, 2000; Kureshy y Allen Davis, 2000; Velasco <i>et al.</i> , 2000;	Depende de la especie para <i>L. Vannamei</i> es del 6 al 22

Concentrado de Soya				
Características	Cualitativo	Cuantitativo	Autores	Comentario
% Proteína	+++	Casi el 100%	Smith <i>et al.</i> , 2000	Es uno de los nutrientes mas usados en la nutrición animal
% Proteína Cruda	+++	92%	NRC, 1983	Es una de la fuente mas usadas en la Acuicultura
Materia seca				
a.a. Limitantes	bajos	Casi el 100% (limitante solo en Metionina)	Akiyama <i>et al.</i> , 1991	Es por eso una de las fuentes mas usadas
Palatabilidad	Positiva			Si no se encuentran factores antinutricionales
Digestibilidad in vivo	+++	Casi el 100%	Divakaran <i>et al.</i> , 2000 y Smith <i>et al.</i> , 2000	
Digestibilidad in vitro	+++	55 - 96 %		
Digestibilidad proteína	+++	92%	Smith <i>et al.</i> , 2000	Proporciona una digestibilidad positiva
Digestibilidad m.c.	+++	67%	Smith <i>et al.</i> , 2000	
Digestibilidad energía	+++	71%	Smith <i>et al.</i> , 2000	
Factores antinutricionales	+++	Inhibidores de las Proteasas, Taninos, Lectinas, etc	Huisman <i>et al.</i> , 1991	Factores que se puede neutralizar con calor y otros tratamientos.
uso en la acuicultura	+++	En dietas para peces y crustáceos	Akiyama 1988	
Uso en la camaricultura	+++	En especies carnívoras y hervívoras	Tacón 1989 y Hertrampf y Pascual 2000	Los autores realizan una recomendación general para la inclusión del trigo y sus productos en dietas para crustáceos
Nivel de inclusión	+++	25 al 75%	Akiyama 1988	No es recomendable una inclusión tan alta, es mejor no pasar del 40 %

Gluten de Trigo				
Características	Cualitativo	Cuantitativo	Autores	Comentario
% Proteína	+++	2 - 26 %	Tomado de Hertrampf & Piedad-Pascual, 2003	Siempre y cuando sea en forma de Gluten, pues contiene entre el 75 y 80 % de la proteína.
% Proteína Cruda		14.30%	Tomado de Hertrampf & Piedad-Pascual, 2003	
Materia seca				
a.a. Limitantes		Lisina, treonina, valina		
Palatabilidad	Baja			
Digestibilidad in vivo	+++	92.4 +/- 0.6		
Digestibilidad in vitro	+	25.9 +/- 2.7		
Digestibilidad proteína		81 - 98 %	Davies y Arnold 1995 y Bruson y Romaine 1994	
Digestibilidad m.c.		85 - 100 %	Davies y Arnold 1995 y Bruson y Romaine 1994	
Digestibilidad energía		71%	Bruson y Romaine 1994	
Factores antinutricionales	+++	Fitoheglutininas, ácido fítico, factor flatulento, inhibidor de amilasa y posible contaminación con aflatoxinas. inhibidor de la tripsina e inhibidor de la invertasa	Tacón, 1989 y Hertrampf & Piedad-Pascual, 2003	Factores que se puede neutralizar con calor y otros tratamientos.
Factor de crecimiento	No se reporta.			No se reporta.
uso en la acuicultura	+++	En dietas para peces y crustáceos		
Uso en la camaricultura	+++	En especies carnívoras y hervívoras	Tacón 1989 y Hertrampf y Pascual 2000	Los autores realizan una recomendación general para la inclusión del trigo y sus productos en dietas para crustáceos
Nivel de inclusión	+++	5- 20 %	Tacón 1989 y Hertrampf y Pascual 2000	Según la edad y especie.

Papa				
Características	Cualitativo	Cuantitativo	Autores	Comentario
% Proteína	+	2 - 25 %	Tomado de Hertrampf & Piedad-Pascual, 2003	
% Proteína Cruda	+++	82.00%	Tomado de Hertrampf & Piedad-Pascual, 2003	La proteína tiene alto valor si es en forma de concentrado
Materia seca				
a.a. Limitantes		Con altos valores, en casi todos.	Tomado de Hertrampf & Piedad-Pascual, 2003	Rico en Metionina Histidina, Triptofano y Trionina
Palatabilidad	Baja			
Digestibilidad in vivo	+++		Coelho y Massamit- Furuya., 2005	
Digestibilidad in vitro	+	18 - 24 %	Coelho y Massamit- Furuya., 2005	Dependiendo si se analiza en forma de ingrediente o en una dieta
Digestibilidad proteína		74%		
Digestibilidad m.c.		68%		
Digestibilidad energía		75%		
Factores antinutricionales	+++	solanina, Glicoalcaloides		
Factor de crecimiento	No se reporta.			No se reporta.
uso en la acuicultura	+	Salmónidos y crustáceos	Merican y Smith 1995	
Uso en la camaricultura	+	Especies Carnívoras y hervidoras	Merican y Smith 1995	
Nivel de inclusión		0.6 - 10 %	Moyano <i>et al.</i> , 1992).	

ANEXO B

Glosario

Absorción: Transporte de los productos de la digestión desde el tracto digestivo hasta la sangre TR difusión facilitada (esp), difusión simple (esp), pinocitosis (esp), transporte activo (esp) (Chong y Vega 2003).

Actividad proteolítica: Capacidad de las enzimas de hidrolizar enlaces peptídicos en las proteínas (Chong y Vega 2003).

Alimento artificial: Alimento que contiene nutrientes en cantidades y proporciones que satisfacen necesidades fisiológicas de los animales especificadas por autoridades reconocidas en nutrición animal (Chong y Vega 2003).

Alimento completo: Alimento nutricionalmente adecuado para un animal específico y para un determinado estado fisiológico, su composición permite ser administrado como la única dieta y es capaz de mantener la vida o promover la reproducción o ambos sin el consumo de ninguna otra sustancia adicional excepto agua (Chong y Vega 2003).

Alimento formulado: Alimento compuesto por dos o más ingredientes proporcionados, mezclados y procesados de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Chong y Vega 2003).

Alimento vivo: Alimento conformado por organismos vivos Ej.: microalgas, artemias, copépodos (Chong y Vega 2003).

Aminoácido: Compuesto orgánico que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo en su estructura; principal componente de las proteínas, por lo que su distribución y concentración determina las propiedades de estas (Chong y Vega 2003).

Aminoácido esencial: Aminoácido que no puede ser sintetizado o que se sintetiza en cantidades insuficientes para cubrir los requerimientos óptimos de una determinada especie, por lo tanto debe ser suministrado en la dieta TR leucina (esp), isoleucina (esp), lisina (esp), metionina (esp), triptófano (esp), treonina (esp), valina (esp), arginina (esp), histidina (esp), metionina (esp), cistina (esp), fenilalanina (esp), tirosina (esp) (Chong y Vega 2003)

Asimilación: Proceso de transformación de sustancias ajenas en sustancias propias del protoplasma; es distinto en los organismos autótrofos que en los heterótrofos (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Caseína: Proteína fundamental de la leche. Nota: ingrediente utilizado como proteína de referencia en estudios de nutrición (Chong y Vega 2003).

Dieta: Régimen de alimentación controlado, término referido al alimento balanceado (Chong y Vega 2003).

Digestión: Proceso de degradación química de los alimentos ingeridos a formas más

sencillas, que puedan ser absorbidas y asimiladas por el organismo. Puede ser extracelular, como en la mayor parte de los animales, o intracelular como en el caso de la captura fagocítica en protozoos y celentéreos (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Digestión: Proceso fisiológico que se basa en la transformación de los alimentos en el aparato digestivo a través de una hidrólisis enzimática que fracciona los polímeros de los nutrientes en pequeñas moléculas capaces de ser asimiladas por las células del intestino y transportadas al torrente circulatorio para su distribución (Chong y Vega 2003).

Electroforesis: Técnica para separar moléculas en una matriz (agarosa o poliacrilamida) de acuerdo a su carga eléctrica y tamaño (Chong y Vega 2003).

Endoproteinasa: Enzima que hidroliza enlaces peptídicos en la parte interna de la cadena polipeptídica (Chong y Vega 2003).

Enlace peptídico: Enlace que une a los aminoácidos para formar proteínas, se origina por la condensación del grupo alfa-amino de un aminoácido con el grupo alfa-carboxílico de otro aminoácido con pérdida de agua (Chong y Vega 2003).

Enzima: Biomolécula tanto proteína como RNA que cataliza una reacción específica y acelera la velocidad de las reacciones biológicas (Chong y Vega 2003).

Hidrólisis: Reacción química en la cual el agua interacciona con otra sustancia para formar una o más sustancias nuevas (Chong y Vega 2003).

Hidrolizado: Producto de la hidrólisis química y/o enzimática (Chong y Vega 2003).

Hidrolizado de Proteína: Es el producto de proteína solubilizado enzimáticamente en la materia prima por una hidrólisis de proteína limitada.

Inhibidor enzimático: Sustancia que en contacto con las enzimas inhibe su actividad de manera reversible o irreversible.

Nutrición: Proceso por el que los organismos utilizan el alimento para la obtención de la energía relativa al crecimiento, mantenimiento y reparación: Los dos tipos principales son la nutrición autótrofa y la heterótrofa (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Nutriente: Elemento del agua o del suelo que plantas y animales son capaces de ingerir como alimento (Diccionario Esencial de las Ciencias, 2000).

Requerimiento nutricional: Cantidad mínima de un nutriente que logra el máximo de crecimiento y una salud óptima (Chong y Vega 2003).

Sustrato: Material que recubre el fondo de un ambiente acuático, puede ser usado para describir nutrientes presentes en procesos metabólicos o como medio para crecimiento

bacteriano. En bioquímica: compuesto biológico que es transformado por la acción de las enzimas (Chong y Vega 2003).

Glosario de abreviaciones

%H: Porcentaje hidrólisis.

FAN: Factores anti-nutricionales.

CDA: Coeficientes de digestibilidad aparente.

D1: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de concentrado proteico de soya.

D2: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de gluten de trigo.

D3: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de concentrado proteico de papa.

D4: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de *Spirulina*

D5: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de coctel vegetal.

D6: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de Harina de Calamar.

DC: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de Harina de Calamar.

DVM: Tratamiento de organismos alimentados con una dieta con 30% de coctel vegetal mejorado

ED: Energía digerible calculada

EEXV: Energía utilizada para la muda

GH: Grado de hidrólisis total

HeE: Energía de la respiración de rutina en ayuno

HiE: Energía del incremento de calor aparente

pl: Postlarva

RE: Retención de energía para el crecimiento

UE: Excreción amoniaca de ayuno

ZE: Energía de excreción amoniacal post-alimentaria

Lista de tablas

Tabla 1.1 Composición de las dietas para la evaluación de la digestibilidad *in vitro*. D1 (dieta con concentrado proteico de soya), D2 (dieta con gluten de trigo), D3 (dieta con concentrado proteico de papa), D4 (dieta con *Spirulina* yucateca), D5 (dieta con coctel vegetal) y D6 (dieta con harina de calamar)

Tabla 1.2 Composición en porcentaje de inclusión para formar el coctel vegetal.

Tabla 1.3 Grado de hidrólisis total (GH) y Porcentaje hidrólisis (%H) de los diferentes ingredientes.

Tabla 1.4 Porcentaje hidrólisis de las diferentes dietas. D1 (concentrado proteico de soya), D2 (gluten de trigo), D3 (concentrado proteico de papa), D4 (*Spirulina* yucateca), D5 (coctel vegetal) y D6 (harina de calamar)

Tabla 2.1 Composición de las dietas de los Experimentos I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa) Experimento II. Tratamientos D4 (*Spirulina*), D5 (coctel) y D6 (calamar).

Tabla 2.2 Composición en porcentaje de inclusión para el coctel vegetal.

Tabla 2.3 Cómputo químico de las dietas de los Experimentos I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa) y Experimento II. Tratamientos D4 (*Spirulina*), D5 (coctel) y D6 (calamar).

Tabla 2.4 Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de la proteína, energía y materia seca del Experimento I. Tratamientos D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Tabla 2.5 Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día del Experimento I. Tratamientos D1 (soya) D2 (trigo) D3 (papa).

Tabla 2.6 Modelo del balance bioenergético en porcentaje de energía digerible calculada para el Experimento I. Tratamientos D1 (soya) D2 (trigo) D3 (papa).

Tabla 2.7 Proteína soluble (mg/ml) y actividad específica (mU/mg de proteína) de la tripsina y la quimotripsina del Experimento I. Tratamientos D1 (soya) D2 (trigo) D3 (papa).

Tabla 2.8 Fuerza requerida para la penetración del músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento I. Tratamientos D1 (soya) D2 (trigo) D3 (papa).

Tabla 2.9 Actividad de la colagenasa en músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento I. Tratamientos D1 (soya) D2 (trigo) D3 (papa).

Tabla 2.10 Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) proteína, energía y de materia seca del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tabla 2.11 Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tabla 2.12 Modelo del balance bioenergético en % del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*) D5 (coctel vegetal) D6 (calamar).

Tabla 2.13 Proteína total soluble (mg/ml) y actividad específica de la tripsina (mU/mg de proteína) y la quimotripsina (mU/mg de proteína) del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar)).

Tabla 2.14 Fuerza requerida para la penetración del músculo de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tabla 2.15 Actividad de collagenasa en músculo de camarón de los juveniles de *L. vannamei* del Experimento II. Tratamiento D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Tabla 3.1 Composición de las dietas de los experimentos I. para postlarvas Experimento II. Para juveniles.

Tabla 3.2 Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día del Experimento I (postlarvas). En tratamientos DC (calamar) y DVM (vegetal).

Tabla 3.3 Modelo del balance bioenergético en % del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Tabla 3.4 Proteína soluble (mg/ml) y actividad específica (mU/mg de proteína) de la tripsina y la quimotripsina del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Tabla 3.5 Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Tabla 3.6 Modelo del balance bioenergético en % del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Tabla 3.7 Proteína total soluble (mg/ml) y actividad específica de la tripsina (mU/mg de proteína) y la quimotripsina (mU/mg de proteína) del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Lista de figuras

Figura 2.1 Relación de la supervivencia del Experimento I Tratamientos: D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Figura 2.2 Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento I Tratamientos: D1 (soya), D2 (trigo) y D3 (papa).

Figura 2.3 SDS PAGE gel realizado con pooles de hepatopáncreas de *L. vannamei*, M: marcador de peso molecular. **Línea 1:** banda de camarones alimentados con el tratamiento D1 (soya). **Línea 2:** banda de camarones alimentados con el tratamiento D2 (trigo). **Línea 3:** banda de camarones alimentados con el tratamiento D3 (papa). Las flechas hacia arriba muestran la actividad de la Tripsina y hacia abajo la actividad de la Quimotripsina.

Figura 2.4 Relación de la supervivencia (%) del Experimento II. Tratamiento: D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Figura 2.5 Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento II. Tratamiento: D4 (*Spirulina*), D5 (coctel vegetal) y D6 (calamar).

Figura 2.6 SDS PAGE gel realizado con pooles de hepatopáncreas de *L. vannamei*, MWM: marcador de peso molecular, Línea 1: banda de camarones alimentados con la D4 (*Spirulina*), Línea 2: banda de camarones alimentados con la D5 (coctel vegetal) y Línea 3: banda de camarones alimentados con la D6 (Harina de calamar). Las flechas hacia arriba muestran la actividad de la tripsina, y abajo la actividad de la Quimotripsina.

Figura 2.7 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes del colágeno extraído del camarón (*L. vannamei*). Carril A: Marcador de peso molecular; Carril B: Colágeno soluble en sal extraído del musculo de la D1 soya; Carril C: Colágeno soluble en sal extraído del músculo de D2 trigo; Carril D: Colágeno soluble en sal extraído del músculo del D3 papa; Carril E: Colágeno soluble en sal extraído músculo de D4 *Spirulina*; Carril F: Colágeno soluble en sal extraído de músculo de D5 Coctel y Carril G: Colágeno soluble en sal extraído del músculo de D6 calamar.

Figura 3.1 Porcentaje de Supervivencia del Experimento I (postlarvas). Tratamiento: DC (calamar) y DVM (vegetal).

Figura 3.2 Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento I (postlarvas). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Figura 3.3 Porcentaje de Supervivencia del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Figura 3.4 Coeficiente diario de crecimiento (%/día) del Experimento II (juveniles). Tratamiento DC (calamar) y DVM (vegetal).

Bibliografía.

Alder-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier, London, pp 427.

Akiyama, D. M. 1991. Soybean meal utilization by marine shirmp. en Akiyama D. M; Tan, RKH (eds). Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thailan and Indonesia, Singapore, pp. 207-225.

Akiyama, D.M.; Coelho, S.R.; Lawrence, A.L. y Robinson, E.H. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Nippon Suisan Gakkaishi, **55 (1)**: 91-98

Akiyama, D.M.; Dominy, W.G. y Lawrence, A.L. 1991. Penaeid shrimp Nutrition for the comercial feed industry, revised. En: D.M. Akiyama y R.K.H. Tan, (Eds.), 1991, Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. American Soybean Association, Singapore, Sep 12-25, Thailand and Indonesia, pp. 80-98.

Akiyama, D. M.; Dominy, W. y Lawrence, A. 1992. Penaeid shrimp nutrition. En: Fast, AW Lester, L. J. Eds. Marine Shrimp Culture; Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam. pp. 535-568.

Alcivar-Warren, A.; Overstreet, R.; Dhar, A.; Astrofsky, K.; Carr, W.; Sweeney, J. y Lotz, J. 1997. Genetic Susceptibility of Cultured Shrimp *Penaeus vannamei* to Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and Baculovirus penaei: Possible Relationships with Growth Status and Metabolic gene Expression. Journal of Invertebrate Pathology. **70** : 190-197

Amaya, E. A.; Davis, D. A. y Rouse, D. B. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. Aquaculture, **262**: 393-401.

Anderson, S. J.; Lall, S. P.; Anderson, D.M. y McNiven, M. A. 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by Chemicals and biological assays. *Aquaculture* **115**: 305-325

Arena, L.; Gaxiola, G.; Cuzon, G.; Espinosa, G.; Van Wormhoudt, A. y Rosas. C. 2004. Molecular genetic analysis of shrimp *L. vannamei* wild and domesticated populations using allozymes and mitochondrial DNA markers. Of a amylase and 16S gene.

Bautista-Teruel M.; Eusebio P. y Welshn P. 2003. Utilization of feed pea *Pisum sativum* meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **225**: 121-131.

Beamish, F.W.H. 1975. Apparent SDA of large mouth bass, *Micropterus salmoides*. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**: 1763 - 1769.

Belay, A.; Kato, T. y Ota, Y. 1996. *Spirulina (Arthrospira)*: Potential application as an animalfeed supplement. *Journal of Applied Phycology* **8**: 303-311.

Bell, J.M. 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. *Can. J. Anim. Sci*; **77**: 679-697

Borlongan, I. G.; Eusebio, P. S. y Welsh T. 2003. Poetential of feed pea (*Pisum sativum*) meal a a protein source in practical diets for milk fish (*Chanos chanos* Forsskal). *Aquaculture* **225**: 89-98.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizingthe principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.

Brown, C.L. y Bern, H. A. 1986. Thyroid hormones in early development, with special reference to teleost fishes. In: Scanes, C. G. And Schriebman, M.P. (eds) *Hormones in*

Development, Maturation and Senescence of Neuroendocrine Systems. Academic Press, San Diego, pp. 289-306

Brunson, J. F.; Romaine, R.P. y Reigh, R.C. 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *P. setiferus*. *Aquaculture Nutrition*, **3**: 9-16.

Bureau, D. P. 2002. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans: *Aquaculture*, **212**, (1-4): 404-405

Cabanillas-Beltrán, H.; Ponce-Palafox, J.T.; Martínez-Palacios, C.A.; Chávez-Sánchez, M.C. y Ross, L.G. 2001. Comparación de la digestibilidad de dietas a base de harina de pescado y harina de soya en *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, utilizando diferentes temperaturas y salinidades de cultivo. *Ciencias Marinas*, **27** (4) 578-593.

Chamberlain, J. C.; Hill, D. M. y Shenkin F. 1995. Genetic determinants of the response to fluvastatin therapy in hypercholesterolaemia: the role of the lipases and apolipoprotein A-II loci Atherosclerosis, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **115** (1): 95.

Cho, C. y Bureau, D.P. 1998. Development of bioenergetic models and the *Fish-PrFEQ* software to estimate production, feeding ration and waste output in aquaculture. *Aqua.Liv. Res.* **11**: 199-210.

Chou R.L.; Her B. Y.; Su M. S.; Hwang G; Wu Y. H. y Chen H. Y. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum* *Aquaculture* **229**: 325-333

Chu, K.H. y Ovsianico-Koulikowsky, N.N. 1994. Ontogenetic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **183**: 11-26.

Coelho Emerenciano, M. y Massamitu-Furuya W. 2005. Ensilado de maíz en dietas para postlarva de camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*. Trabajo presentado en el XXV Congreso de Ciencias del Mar del Viña del Mar.

Colvin, P.M. 1976. Nutritional studies on penaeid prawns: protein requirements in compounded diets for juvenile *Penaeus indicus* (Milne Edwards). *Aquaculture* **7**: 315-326.

Cordoba-Murueta, J. y García-Carreño, L. 2001. Nutritive value of squid and hydrolysed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* **210**: 371-384.

Córdova-Murueta, J. y García-Carreño, L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* **210**: 371-384.

Cordova-Muruta J.; García-Carreño F. L. y Navarrete del toro, A. 2003. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **297**: 43-56.

Coutteau, P.; Camara, M.R. y Sorgeloos, P. 1996. The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance and fatty acid composition of postlarval *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **147**: 261– 273.

Cruz-Suárez, L.E. y Guillaume, J. 1987. Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *Journal of the World Aquaculture Society*. **18**: 209

Cruz-Suárez, L.; Rique, D. y AQUACOP. 1992. Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. *Aquaculture* **106**: 293-299.

Cruz-Suárez, L.E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, 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– 101.

Cuzon, G.; Lawrence, A.; Gaxiola, G.; Rosas, C. y Guillaume, J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* **235**: 513-551.

Cuzon G. y Guillaume J. 1997. Détermination de l'optimum de croissance selon le rapport protéines-énergie chez la crevette. *Aquatic Living Resources*, **3**: 123-132.

Cuzon, G.; Brito, A.; Jiménez-Yan, L.; Brito, R.; García, T.; Taboada, G. y Gaxiola, G. 2003. The effects of animal or plant-based diets on energy partitioning in selected ontogenetic stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Memorias de VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Hermosillo, Sonora.

Davis, D.A. y Arnold, C.R. 1995. Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **133**: 287-294.

Davis, D.A. y Arnold, C.R. 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **114**: 285-292.

Davis, D.A. y Arnold, C.R. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **185**: 291_298.

Davis, D.A.; Arnold, C.R. y McCallum, I. 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* **8**: 87-94.

Davis, G.P. y Hetzel, D.J.S. 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture Research* **31**: 3-10.

Dimes, L. y Haard N. 1994. Estimation of protein digestibility. I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*), *Comp. Biochem. Physiol.* **108 A**: 349-362.

Dimes, L.E.; Haard, N.F.; Dong, F.M.; Rasco, B.A.; Forster, F.T.; Fairgrieve, W.T.; Arndt, R.; Hardy, R.W.; Barrows, F.T. y Higgs, D.A. 1994 . Estimation of protein digestibility: II. *In vitro* assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* **108A**: 363–370.

Divakaran, S. y Ostrowski, A. 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. *J. World Aquacult. Soc.* **21**: 35-39.

Divakaran, S.; Velasco, M.; Beyer, E.; Forster, I. y Tacon, A. G. J. (2000). Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei* including a critique of methodology. En: Cruz-Suárez, L. E; Ricque-Marie, D; Tapia-Salazar, M; Olvera-Novoa, M. A; Civera-Cerecedo R; (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatán, México.

Eckhoff, K. M.; Aidos, I.; Hemre, G. I. y Lie, O. 1998. Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) and subsequent changes in solubility during storage on ice. *Food Chem.*; **62**: 197-200.

Emmans, G.C. (1994) Effective energy: a concept of energy utilization applied across species. *Br. J. Nutr.* **71**: 801-821.

Ezquerro, J.M.; Garcia-Carreno, F.L.; Civera, R. y Haard, N.F. 1997 a. pH-stat method to predict proteina digestibility in white shrimp *Penaeus vannamei*.. *Aquaculture* **157**: 249–260.

Ezquerro, J.M.; Garcia-Carreno, F.L. y Haard, N.F. 1997 b. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp *Penaeus vannamei*.. *J. Food Biochem.* **21**: 401–419.

Ezquerro, J.M.; Garcia-Carreno, F.L. y Carrillo, O. 1998. *In vitro* digestibility of dietary proteina sources for white shrimp *Penaeus vannamei*.. *Aquaculture* **163**: 123–136.

Ezquerria, J.M.; Jesffls, B.; Salazar, L.; Bringas, L. y Rouzaud, O. 2003. Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *European food research & technology*, **217** (4): 277-280.

Ezquerria-Brauer, J.M.; Bringas-Alvarado, L.; Burgos-Hernández, A.; Rouzaud- Sánchez, O. 2004. Control de la composición química y atributos de calidad de camarones cultivados. 452. En: Cruz-Suárez, L.E.; Ricque-Marie, D.; Nieto-López, M.G.; Villareal, D.; Scholz, U. Y González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16- 19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Falquet, J. 1996. "Spiruline, Aspects nutritionnels", *Antenna Technologie*, Genève. Göhl, B. (1991): Tropical feeds.FAO/Oxford Computer Journal LTD.Ver 1.7

Fang, L.-S. y Lee, B.-N. 1992. Ontogenetic change of digestive enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 1033–1037.

Fenucci, L.L.; Zein-Eldin, Z. P. y Lawrence A.L. 1988. The nutritional response of two penaeid species to various levels of squid meal in a prepared feed. *Proc World Maricul. Soc.* **11**: 403-409

Fenucci J.L.; Zein-Eldin Z.P. y Lawrence A.L. 1980. The nutritional response of two penaeidspecies to various levels of squid meal in a prepared feed. *Proceedings World MaricultureSociety* **11**, 403-409.

Fenucci J.L.; Fenucci, A.C.; Lawrence, A.L. y Zein Eldin, Z. 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp *L. stylirostris*. *Journal World Aquaculture Society* **13**: 134-135.

Forrellat, A.; Gonzalez, R. y Carrillo, O. 1988. Evaluación de la calidad proteica de alimentos para camarones. *Rev. Inv. Mar.* **9(1)**: 81-90.

Forrellat, A. (1998). El hepatopáncreas de camarón: fuente de enzimas digestivas en la camaronicultura. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana. 100pp.

Forster, I.P.; Dominy, W; Obaldo, L. y Tacon, A.G.J. 2003. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. **219**: 655-670.

Forster, J. R. M. y Gabbot, P.A. 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **51**: 943-961.

Franco, O.L.; Rigden, D.J.; Melo, F.R. y Grosside-Sá. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* **269**: 397-412.

Freeman, M.; Misciattelli, N.; Che, Z.; Cob, C.A.; Martinez-Palacios.; Alabi A.O. y Jones. D.A.1996. Preliminary trial demonstrating the replacement of algae with microencapsulated diets in penaeid larval culture. 3er. Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey Nvo. León 11-13 Noviembre de 1996.

Friess, W. 1998. Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **45(2)**: 113-136.

Galindo, J.; Fraga, I.; González, R. y Álvarez, J.S. 2000 Aproximación a los requerimientos nutricionales de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*: Evaluación de niveles y fuentes proteicas. Memorias V Congreso de Ciencias del Mar MARCUBA'2000. CD-ROM.

Galgani, M.L.; Benyamin, Y. y Ceccaldi, H.J. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* _Forsk. a comparison with *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem.*

Physiol. **78B**: 355–361.

Galgani, M.L.; Benyamin, Y. y Van Wormhoudt, A. 1985. Purification, properties and immunoassays of trypsin from the shrimp *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B**: 447–452.

Gallardo, N.; González, R.; Carrillo, O.; Valdés O. y Forrellat A. 1989. Una aproximación a los requerimientos de aminoácidos esenciales de *Penaeus schmitti*. *Rev. Inv. Mar.* **10(3)**: 259-268.

Galindo, J.; Fraga, I.; De Arazoza, M.; Fajer, E.; González, R. y Forrellat, A. 2001. Evaluación de diferentes niveles de proteína en el crecimiento de juveniles de camarón rosado *Penaeus notialis*. *Revista de Investigaciones Marinas.* **1**: 39-44.

Gamboa-Delgad, J.; Molina-Poveda, C. y Cahu, C. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *L. vannamei* as a function of body weight. *Aquaculture research* **34(15)**: 1403-1411

García-Carreño, F.L.; del Toro A. N. y Ezquerro. M.1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility *in Vitro*. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology* **5**: 36-40.

García-Galano, T.; Villarreal-Colmenares, H. y Fenucci, J. L. (Eds.). 2007 *Manual de ingredientes protéicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos*. Eudem, ISBN: 978-987–1371-02-0

Gaxiola G. 1994. Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *P. duorarum* (crustacea; Penaeidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 214 pp.

Gaxiola, G.; Cuzon, G.; Garcia, T.; Taboada, G.; Brito, R.; Chimal, M. E.; Paredes, A.; Soto, L.; Rosas, C. y Wormhoudt, A. 2005 Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A **140**: 29-39.

Geiger, R. 1988. Chymotrypsin. In: Methods of enzymatic analysis. Vol. V. Enzymes: Third Edition. Bergmeyer, J. and Grab, M. (eds.). Chemie Verlag. Weinheim: 99-104.

Geiger, R. y Fritz, H. 1988. Trypsin. Methods of enzymatic análisis. Vol V. Enzimas peptidazas, proteinazas and their inhibitors. 3° edition. Bergmeyer, J. And Grab, I.M. pp. 199-124.

Grabner, M. 1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. Aquaculture, **18**: 97-110.

Goytortúa-Bores, E. 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento del camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. S.L.P. pp. 112.

Grabner, M. 1985. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. Aquaculture 48, 97-110.

Griffiths, D.W. (1981) J. Sci. Food Agric. **32**: 797.

Griffiths, D.W. (1984). J. Sci. Food Agric. **42**: 468.

Guillaume, J.; Kaushik, S.; Bergot, P. y Metailler, R. 2001. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Springer Praxis Books. Food Sciences . XXIV, pp. 408

Guzmán, C.; Gaxiola, G.; Rosa, C. y Torre-Blanco, A. 2001. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. *Aquaculture Nutrition* **7**: 113 –122.

Haard Norman F. 1992 Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish *Food Research International*, **25 (4)**: 289-307

Hajen, W.; Beames, R.; Higgs, D. y Dosanjh, B. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water, 2. Measurement of digestibility. *Aquaculture*, **112**: 333-348.

Hardy R.W. y Masumoto T. 1991. Specifications for marine by-products for aquaculture. En Akiyama, D.M. & Tan, R.K.H. (Eds.),. *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*. Thailand and Indonesia, 19-25 September, 1991, pp. 99-108.

Hardy, R. W. 1999. Alternate protein sources. *Feed Managements*, **50**: 25-28.

Hertrampf J.W y Piedad-Pascual F. 2000. *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 177-191.

Hertrampf, J.W. y Pascual, F.P. 2000a. *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. Kluwer Academic Publishers Soya protein products **42**: 397-402

Hertrampf, J.W. y Pascual, F.P. 2000b. *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. Kluwer Academic Publishers Vegetable Oil Meals **46**: 483-493

Herrera, M.M. 2008 Digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de ingredientes utilizados en alimentos para el cultivo del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* Instituto Tecnológico de Durango Tesis pp. 107

Higuera, M. y Cardenete H. 1987. Fuentes alternativas de proteína y energía en acuicultura. Proteínas de organismos unicelulares. En Seminario Alimentación en acuicultura. J. Montero E. Y U. Labart. (Eds.) pp: 71- 77

Hsu, H. W.; Vayak, D. L.; Satterlee, L. D. y Miller G. A. 1977: A multienzymatic technique for estimating protein digestibility. J. Food. Sci, **42**: 1269.

Huisman, J. *et al*; (1991) En: Fifth Int. Symp. Digestive Physiology in Pigs. EAAP Pub. pp: 108.

Hunter, B.; Pruder, G. y Wyban, J. 1987. Biochemical composition of pond biota, shrimp ingesta, and relative growth of *Penaeus vannamei* in earthen ponds. Journal of the World Aquaculture Society, **18 (3)**: 167-174.

Hunter, J. y Feller R. F. 1987. Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from South Carolina tidal creek. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **107**: 61-70.

Jaffé, W.G. (1980) En: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Academic Press. pp: 102.

Jiménez-Yan. 2004. Alimentos amigables con el ambiente y su efecto en el crecimiento, supervivencia y estado fisiológico de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de licenciatura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, pp. 49.

Jaime, B.; Hernández-Llamas, A.; García-Galano, T. y Villarreal. H. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. Aquaculture **260**: 215–220.

Johnston, D. J. y Yellowlees, D. 1998. Relationship between preferences and digestive enzyme complement of the slipper lobster *Thelus orientalis* (Decapoda: Scyllaridae)

Journal of Crustacean Biology **18**: 656-665.

Kanazawa, A.; Teshima, S. y Sakamoto, M. 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture*, **50**: 39-49.

Kemasamaru, K.; Mae, M. y Fukuda H. 1972. Studies on the nutritive value of wheat-germ as an ingredient of the diet for cultured fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **38 (7)** : 677-683.

Kim, K.I.; Kayes, T.B. y Amundson, C.H. 1991. Purified diet development and re-evaluation of the dietary protein requirement of fingerling rainbow trout. *Aquaculture*, **96**: 57-67.

King, T.P. *et al*; (1983) *J. Sci. Food Agric.* 34: 1404.

Kleiber, M. 1975 *The fire of life*. Robert E. Kleiber Publishing Co; New York. 453 p.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laubier-Bonichon, A; Van Wormhoudt, A. y Sellos, D. 1977. Croissance larvaire contro^{le}e de *Penaeus japonicus* Bate: enzymes digestives et changements de regimes alimentaires. **4**, 131-145.

Le Moullac, G.; Van Wormhoudt, y AQUACOP, 1994. Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fiber levels, and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae. En: *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol 6* (ed. by D'Abramo, L.R; Conklin, D.E.y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. pp. 587.

Le Moullac, G. 1995. Adaptation des enzymes digestives à l' alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). En: Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol 6 (ed. by D' Abramo, L.R; Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. pp. 587.

Le Moullac, G.; Klein, B.; Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **208**: 107-125.

Lee, P. G.; Blake, N. J. y Fodrick, G. E. 1980. A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Proceedings of the World Mariculture Society **11**: 392-402.

Lee, P. G.; Smith, L. L. y Lawrence, A. L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture **42**: 225-239.

Lee, P. G. y Lawrence, A. L. 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Journal of the World Mariculture Society **16**: 257-287.

Lehninger, A. L. 1995. Bioquímica. OMEGA. Barcelona, España.

Lemos, D.; Ezquerro M.; García-Carreño F.L. y Phan V.N. 2001. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitor and feed digestibility. Aquaculture. **186**: 89-105.

Lemos, D.; Hernández-Cortés, M.P.; Navarrete, M.A. y García-Carreño F.L. 1999. Ontogenic variation in digestive proteinase activity of larval and postlarval pink shrimp *F. paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Marine Biology. **135**: 563-662.

Lemos, D.; Ezquerro, J.M. y García-Carreño, F.L. 2000. Protein digestión in penaeid shrimp: Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*. **186**: 89-105.

Lemos, D. Y Rodríguez, A. 1998, Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. *Aquaculture* **160**: 103-116.

Lemos, D.; Navarrete, A.; del Toro, J.; Córdova-Muruetab, H. y Garcia-Carreño F. 2004. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteins inhibition. *Aquaculture*, **239**: 307-321

Leterme, P. y Beckers, L. (1989) *Rev. Agric.* 42: 469.

Liener, I.E. 1980. Heat-labile antinutritional factors. En: R.J. Summerfield and A.H. Bunting (Editors), *Advances in Legume Science*. Royal Botanic Gardens, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Great Britain. pp. 157-177.

Liener, I.E. 1994. Implications of Antinutritional Components in Soybean Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **34**:31-67

Lhoste, E. F.; Fiszlewics, M.; Gueugneau, A. M. y Corring, T. 1994. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat strain on enzyme induction and messenger mRNA levels. *Journal of Nutrition and Biochemistry* **5**: 84-94.

Lim, C.; Klesius, P.H. y Dominy, W. 1998. Soybean products. *Internacional Aqua Feeds*, **3**: 17-23

- Longstaff, M.A. y McNab, J.M. 1991. Anim. Feed Sci. Tech. **34**: 147.
- Lovett, R. T. 1991. Use of soybean products in diets for aquaculture sepecies: revised. En Proc of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thaland and Indonesia.
- Lovett, D.L. y Felder. D.L. 1990a. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Biol. Bull. **178**:144-159.
- Lovett, D.L. y Felder. D.L. 1990b. Ontogenetic Changes in Enzyme Distribution and Midgut function In Development Stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, and Penaeidae). Biol. Bull, **178**:160-174
- Lovett, D.L. y Felder, D.L. 1989. Ontogeny of gut morphology of the White shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Deapoda, Penaeidae). Journal of Morphology **201**: 253-272.
- Maldonado, C., et al., Effect of an herbivorous diet on energy balance of *Litopenaeus vannamei* at selected ontogenetic stages, Aquaculture (2009),
- Maldonado-Flores J.C. 2007. Efecto de alimentos ricos en proteínas vegetales en la nutrición, fisiología digestiva y balance bionergético de reproductores de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 69.
- Maga, J.A. y Lorenz, K. 1973. Taste threshold values which influence flavour properties of certain flours, grans, and oilseed. Cereal Sci. Today, 18:326
- Marletta, L.; Carbonado, M. y Carnavale, E. 1992. *In vitro* protein and sulfur aminoacid availability as a meure of bean protein quality. J. Sci. Food Agric. **59**:497-504
- Marte, C. L. 1980. The food and feeding habit of *Penaeus monodon* Fabricius collected

from Makato river, Aklan, Philippines (Decapoda, Natantia). *Crustaceana* **38 (3)**: 225-236.

Martínez Palacios, C.; Chávez, M.C.; Olvera-Novoa, M.A. y Abdo de la Parra, M.I. 1996 Fuentes alternativas de proteínas vegetales como sustitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola III* pp 279-361

Merican, Z. y Shim, K.F.1995 Apparent digestibility of lipid and fatty acids in residual lipids of meals by adult *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **133**: 275 286.

Miller, E. y Rhodes, R. 1982. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods in Enzymology*, **82A**: 33-64.

Mitaru, B.N.; Reichert, R.D. y Blair, R. 1985. Protein and amino acid digestibilities for chickens of reconstituted and boiled sorghum grains varying in tannin contents. *Poultry Science* **64**: 101–106.

Molina, C. y Piña, 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.

Morales, J.; Montero, P. y Moral, A. 2000. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 2142-2148.

Moss, S. M.; Divakaran, S. y Kim, B. G. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* **32**: 125-131.

Moyano, F. J.; Cardene, G. y de la Higuera. M. 1992. Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable protein for trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Living Resour.*

5: 23-29.

Mustafa, M.G.; Takeda, T.A.; Umino, T.; Wakamatsu, S. y Nakagawa, H. 1994. Effects of *Ascophyllum* and *Spirulina* meal as feed additives on growth performance and feed utilization of Red Sea bream, *Pagrus major*. J. Fac. Appl. Biol. Sci; Hiroshima Univ; **33**: 125-132.

Myer, R.O. y Froseth, J.A. 1983. J. Anim. Sci. **56**: 1088.

Nakata, S. y Kimura, T. 1985. J. Nutr. **115**: 1621.

Nieto-López M. G.; Cruz-Suárez L. E.; Risque M. D. y Ezquerro M. 2005. Técnicas de digestibilidad in-vitro en ingredientes y alimentos para camarón. Ciencia UANL, enero-marzo, año/Vol. VIII, numero 001 Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, México pp. 65-73

Nieto-López, G.M. 2003. Desarrollo de una técnica digestibilidad *in vitro* para el control de calidad de harinas de pescado y alimentos para camarón. Tesis de doctorado. UANL, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, N.L. pp. 81.

Nolasco, H.; Del Monte, A.; Hinojosa, P.; Civera, R. y Vega, F. 2006. Digestibilidad *in Vitro* de lípidos alimentarios para el camarón. Pp. 378. Editores: L. Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie, Mireya Tapia-Salazar, Martha E. Nieto-López, David A. Villarreal-Cavazos, Ana C. Puello-Cruz y Armando García-Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Nowacki, E. 1980. Heat stable antinutritional factors in leguminous plants. en: R.J. Summerfield and A.H. Bunting (Editors), Advances in Legume Science. Royal Botanic Gardens, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Great Britain, pp. 171-177.

Nunes, A. J. P.; Goddard, S. y Gesteira, T. C. V. 1996. Feeding activity patterns of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* **144**: 371–386.

Paine, H. 2002, *Simplemente tome soja*, American Soybean Association-International Marketing (ASA-IM) USB United Soybean Board,

Paoloni A., Grimble R., Pchard, G., 2003. Genetics and Nutrition. *Clinical Nutrition* Vol 22 (5) 429-435

Pascaud, M. 1993 The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response. *Bolletin de l'Institut Oceanographique*, **12**: 49- 58.

Pascual, C.; Zenteno, E.; Cuzon, G.; Sánchez, A.; Gaxiola, G.; Taboada, G.; Maldonado, T. y Rosas C. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, **236**: 431-450.

Peláez, I.; Soto, E.; Bejottes, M.; Herrera, R. y Collazo, M. 1991. Aspectos fisiológicos del amaranto en Cuba. I. Características bioquímicas y nutricionales. Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, México. pp. 80.

Pusztai, A. 1989 En: *Recent Advances Research on ANF in Legume Seeds*. Pudoc. Wageningen, Holanda. pp: 17.

PROFECO. 2006 *¿Quién es quién en los precios ?* Procuraduría Federal del Consumidos. México, D.F: México <http://www.profeco.gob.mx> Visitada: Agosto del 2009

Pérez-Rostro, C.I. 2002. Parámetros genéticos para caracteres del crecimiento, metabólicos y de respuesta a estrés en larvas, juveniles y adultos de camarón blanco (*Litopenaeus*

vannamei). Programa de estudios de postgrado, Tesis de Doctor en Ciencias. Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Acuicultura) CIBNOR,. La Paz, B.C.S. México, diciembre, 162 pp.

Ramos, L.; Molina, J. M.; Pérez, L. y Torres, B. 2001 Producción de nauplios de *Penaeus schmitti* en instalaciones comerciales de maduración en Cuba. Rev. Invest. Mar **15(1)**: 28-38

Ribeiro, F.A.L.T. y Jones D.A. 2000 Growth and ontogenetic change in activities of digestive enzymes in *Fenneropenaeus indicus* postlarvae. Aquaculture Nutrition **6**: 53-64.

Rivas-Vega, M.; Rouzaud-Sandez, O.; Martinez-Cordova L. y Ezquerria Brauer M. 2001. Effect of feed protein level on digestive proteolytic activity, texture and thermal denaturation of muscle protein in reared blue shrimp. J. Aquat. Food Prod. Technol. **10**: 25-38.

Rodriguez, A.; Le Vay, Mourente, G. y Jones, D. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme in larvae y postlarvae of *Penaeus japonicus* and carnivorous feeding. J. Marine Biology. **118**: 45-51.

Robalino, J.; Browdy, C.L.; Prior, S.; Metz, A.; Parnell, P.; Gross, P. y Warr G. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* **78**, 10442-10448.

Rodriguez, M. y Bayley, L. 1987. Can. J. Anim. Sci. **67**: 803.

Rosas, C.; Sánchez, A.; Díaz-Iglesia, E.; Brito, R.; Martínez, E. y Soto, L. A. 1997a. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL10-18) exposed to salinity changes. Aquaculture **152**: 1-4.

Rosas, C.; Sánchez, A.; Gaxiola, G.; Díaz, E.; Brito, R. y Soto, L. A. 1997b. Tasa respiratoria de larvas de *Penaeus setiferus* y *P. schmitti* Burkenroad (Decapoda:

Penaeidae). Rev. Invest. Mar. **18**: 51-57.

Rosas, C.; Ocampo, L.; Gaxiola, G.; Sánchez, A.; y Soto, L. (1999). Effect of salinity on survival, growth and oxygen consumption of postlarvae (PL10-PL21) of *Penaeus setiferus*. J Crust Biol, **19**: 67-75.

Rosas, C.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Pascual, C.; Brito, R.; Chimal, M. y Van Wormhoudt, A. 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *L. vannamei*, *L. Setiferus* y *L. stylirostris*. En: Cruz-Suárez, L. E; Ricque-Marie, D; Tapia-Salazar, M; Olvera Novoa, M. A; Civera-Cerecedo R; (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

Rosas, C.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Arena, L.; Lemaire, P.; Soyez, C. y Van-Wormhoudt, A. 2000b . Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*: Journal-of-Experimental-Marine-Biology-and- Ecology. **28**:181-198.

Rosas, C.; Cuzon, G.; Taboada, G.; Pascual, C.; Gaxiola, G. y Van-Wormhoudt, A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). Aquaculture-Research, **32 (7)**:531-547.

Rosas, C.; Sánchez, A.; Chimal, E.; y Brito, R. 2003. Manual de Métodos para la Evaluación del Balance Energético en Crustáceos. Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental Fac. De Ciencias, UNAM

Rubio, L.A. *et al.*; 1990. Br. J. Nutr. **63**: 419

Samocha, T.M.; Davis, A.D.; Soud, P.I. y DeBault, K. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp,

Litopenaeus vannamei. Aquaculture. **231**: 197-203.

Sarac, H. Z.; McMeniman, N. P.; Thaggard, H.; Gravel, M.; Tabrett, S. y Saunders, J. 1994. Relationships between the weight and chemical composition of exuvia and whole body of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture, **119(2-3)**: 249-258.

Shiau, S.Y. y Peng, S.Y. 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. Aquaculture **101**: 251-250.

Siccardi III, A.J.; Lawrence, A.L.; Gatlin III. D.M.; Fox, J.M.; Castille, F.L.; Perez-Velazquez, M. y González-Félix, M.L. 2006. Digestibilidad Aparente de Energía, Proteína y Materia Seca de Ingredientes Utilizados en Alimentos Balanceados para el Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. 213-237 pp En: Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Slazar, Martha G. Nieto López, David A. Villareal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega (Eds). Avances en Nutrición Acuícola VIII. Memorias del Octavo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 15-17 Noviembre de 2006. Monterrey, Nuevo, México.

Sikorski, Z. y Borderias, J. 1994. Collagen in the muscles y skins of marine animals, pp 58-70. En: Sea Food Protein, Sikorski, ZE, Pan, BS, Shahidi, F (eds). Chapman and Hall, New York.

Sissons, J.W. 1989. En: Advances Animal Nutrition. Butterworths. pp: 261.

Shewry, P. R.; Napie, J. A. y Tatham, A. S. 1995. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. The Plant Cell, **7**: 945-956

Shewry, P. R. y Halford, N. G. 2002. Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. Journal of Experimental Botany, **53**: 947-958

Smith D, y Dall W. 1985. Moulting stage in tiger prawn *Penaeus scudulentus*. In: Second Australian National Seminar, Rothlisberg P. Hill, Staple (eds). Cleveland, pp 85-95.

Smith, D.; Dall, W. y Moore, L. 1992. The natural food of some Australian penaeids. In: Allan, G.L. Dall W (Eds) Proc. Aquaculture Nutrition Workshop NSW Fisheries, Salamander Bay Australia pp 95-96

Smith, D.M.; Tabrett, S.J.; Barclay, M.C. y Irvin, S.J. 2005. The efficacy of ingredients included in shrimp feeds to stimulate intake. *Aquacult. Nutr.* **11**: 263-272.

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

Suárez, J.A; Gaxiola, G.; Mendoza, R.; Cadavid, S.; García, G.; Alanis, G.; Suárez, A.; Faillace, J. y Cuzon. G. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *L. vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* **289**: 118-123.

Sudaryono, A.; Hoxey, M.J.; Kailis, S. G. y Evans, L. H. 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **134**, 313-323.

Sudaryono, A.; Tsuetenko, L. y Evans H. 1996. Digestibility studies of fisheries by products based diet for *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **143**: 331-340.

Tacon, A.G.J. 1997. Fishmeal replacers: review of antinutrients within oilseeds and pulses – a limiting factor for the aquafeed green revolution? In: Tacon, A; Basurco, B; (Eds.), *Feeding Tomorrow's fish*. Cahiers Options Méditerranéennes 22. Institut Agronomique

Mediterranean de Zaragoza, Spain, pp. 153-182.

Tacon, A. G. J. 1993. Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. FAO Fisheries Circular **845**: 64.

Tacon, A.G.J.; 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Proyecto Aquila II. Documento de Campo. **4**: 572.

Takeuchi, T.; Lu, J.; Yoshizaki, G. y Satoh, S. 2002. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw *Spirulina*. Fisheries Science **68**: 34-40.

Teshima, S.; Kanazawa, A. y Sakamoto, M. 1982. Microparticulate diets for the larvae of aquatic animals. Min. Rev. Data File Fish. Res. Kagoshima Univ. **2**: 67-86.

Thiessen, D. 2004. Optimization of feed peas, canola and flaxseed for aquafeeds: The canadian prairie perspective. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Hermosillo, Sonora, México.

Tidwell, J.H.; Webster, C.D.; Yancey, D.H. y D'Abramo, L.R. 1993. Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and distillers' by-products in diets for pond culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 118, 119-130.

Van der Poel, A.F.B. (1990) Anim. Feed Sci. Tech. **29**: 179.

Torres-Mendoza F. (2003) Calidad de la proteína durante el cultivo del camarón blanco (*L. vannamei*): Efecto sobre la textura y actividad colagenasa durante el almacenamiento en hielo. Tesis de licenciatura. Dept. Cien. Quim. Biol.; Univ. Sonora, Hermosillo, México.

Uribe, J. C. y Posada, O. 1998. El uso de comederos en estanques acuícolas. Revista

Acuacultura del Ecuador **28**: 12-14.

Van der Poel, A.F.B. 1990 Anim. Feed Sci. Tech. **29**: 179.

Varnam, A.H. 1998. Carne y productos cárnicos: Tecnología, Química y Microbiología. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 480 pp.

Vega-Villasante, F.; Nolasco-Soria, H.; Chong-Carrillo, O.; Fallarero, A. y Carrillo-Farnés, O. 2004. Functional feeds in shrimp nutrition: the new research? Theoretical concept and practical approach. Panorama Acuícola **9**: 22-27.

Vielma, J.; Makinen, T.; Ekholm, P.; y Koskela, J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. Aquaculture **183**: 349-362.

Williams, S. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists. Inc. pp. 572.

Wilson, R. P. y Poe, W. E. 1985. Relationship of whole body and egg essential amino acid pattern to amino acid requirement in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comp. Biochem. Physiol. **80B**: 385-388.

Yoshinaka, R.; Sato, K.; Itoh, Y.; Nakajima S. y Sato. M. 1989. Content and partial characterization of collagen in crustacean muscle. Comp. Biochem. Physiol.; **94B (1)**: 219-223.

Zar, J. 1999. Biostatistical analysis, Prentice Hall, Forth edition, New Jersey, pp. 661