

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

USO DE BIOMASA RESIDUAL DE LA BIOSÍNTESIS DE
TREONINA COMO FUENTE DE PROTEÍNA ALTERNATIVA A
LA HARINA DE PESCADO EN DIETAS PARA EL CAMARÓN
Litopenaeus vannamei: EFECTOS EN LA DIGESTIBILIDAD
APARENTE Y DESEMPEÑO DE CRECIMIENTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

AKETZALI AMADOR ESQUIVEL

Asesores:

Dr. André Luiz Braga de Souza

M.C. Fernando Yahir García Gómez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

ABRIL, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi familia: mis padres, Elena y Jesús, gracias por estar a mi lado en cada día, bueno o malo, de mi vida apoyando incondicionalmente mis decisiones; a mi hermana, Jazmin, que hizo de esta vida más llevadera; y a mi hermano, Nahum, que siempre me hizo reír en cada oportunidad.

A mis amigos que conocí en la carrera, que les debo el apoyo emocional y académico, gracias, Montse, Zaid, Daniel, Ana, Cyntia, Martha, Muciño, Nancy.

A mis amigos de la vida, Fany, Jess, Jam, Violeta, Arai y por supuesto a Felipe.

A todos los animales que de una u otra manera aportaron en mi educación y formación, sin ustedes esto no hubiera sido posible y espero que me alcance la vida para poder honrar la suya.

AGRADECIMIENTOS

Dr. André Luiz Braga de Souza. Gracias por adoptarme, apoyarme y guiarme siempre que lo necesite, te agradezco infinitamente por ser mi guía en este inicio en la vida académica, pero sobre todo te agradezco por tu amistad.

M.C. Fernando Yahir García Gómez. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de conocer otros lugares.

Dra. María Teresa Viana Castrillón. Gracias por recibirme en su equipo de trabajo, ayudarme siempre que lo necesite e impulsarme a realizar la tesis con ustedes.

Dr. José Antonio Mata Sotres. Por todos los consejos académicos como de la vida diaria.

Aurora Anahi Tinajero Chávez. Sin tu ayuda mi estancia y mi tesis no hubiera sido la misma.

Dra. Arleta Skryńska. y Dra. Esmeralda Chamorro. Por todas las experiencias compartidas, espero podamos colaborar más adelante en esta vida.

Al IIO – UABC. Por tener las puertas a todos los estudiantes.

Al Departamento de nutrición y bioquímica de la FMVZ UNAM. Por tener excelentes académicos que hicieron que me interesara en la nutrición, gracias realmente impactaron en mi vida.

A la FMVZ – UNAM. Por ser mi segundo hogar.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	V
INDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION	3
1.1. Antecedentes	5
1.2. Digestibilidad aparente <i>in vivo</i>	7
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo general	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1. Acondicionamiento previo de los animales	10
4.2. Formulación y elaboración de dietas experimentales	11
4.3. Diseño experimental	16
4.4. Desempeño de crecimiento	17
4.5. Recolecta de muestras	17
4.5.1. Heces	17
4.5.2. Hepatopáncreas	18
4.5.3. Músculo	19
4.6. Digestibilidad aparente <i>in vivo</i>	20
4.7. Análisis de composición proximal	22
4.7.1. Humedad	22
4.7.2. Cenizas	23
4.7.3. Proteína cruda	24
4.7.4. Lípidos	26
4.7.5. Fibra cruda	27
4.8. Análisis estadísticos	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Digestibilidad aparente	30
5.2. Desempeño de crecimiento e índice hepatosomático	31
5.3. Composición proximal del músculo	32
6. DISCUSION	33
7. CONCLUSIONES	39
8. REFERENCIAS	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición proximal en base seca y perfil de aminoácidos de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina.	12
Cuadro 2. Ingredientes y composición proximal en base seca de las dietas experimentales.	13
Cuadro 3. Digestibilidad (% \pm SD) aparente <i>in vivo</i> de la materia seca (MS) y la proteína de la biomasa residual (BR) de la síntesis de treonina y de dietas experimentales para juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> utilizando BR en sustitución de harina de pescado	30
Cuadro 4. Variables de desempeño de crecimiento (media \pm SD) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados con dietas formuladas con biomasa residual (BR) de la síntesis de treonina en sustitución de harina de pescado.	31
Cuadro 5. Composición proximal (g/kg de materia seca \pm SD) del músculo de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados con dietas formuladas con biomasa residual (BR) de la síntesis de treonina en sustitución de harina de pescado.	32

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso de preparación de las dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado para el camarón *Litopenaeus vannamei*. (a) Pesaje. (b) Mezclado de ingredientes en una mezcladora de corte vertical. Preparación de (c) almidón; (d) grenetina. Masa en extrusor (e) saliendo y (f) dentro. Pellets (g) corte; (h) enfriado después del secado. (i) Envasado de las dietas. 15
- Figura 2.** Sistema de recirculación para el bioensayo con juveniles de *Litopenaeus vannamei*, conformado por los 12 tanques ilustrados de color negro y un biofiltro. 16
- Figura 3.** Recolección de heces para calcular la digestibilidad aparente de dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado para el camarón *Litopenaeus vannamei*. (a) Material utilizado en la colecta de heces: criba, pipeta Pasteur y tubos Eppendorf®. (b) Hilos fecales en la criba lavados con agua destilada. (c) Heces en tubos Eppendorf® para congelación. 18
- Figura 4.** Recolección de hepatopáncreas pertenecientes a camarones (*Litopenaeus vannamei*) juveniles alimentados con dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado. (a) Retiro del exoesqueleto del cefalotórax. (b) Extracción del hepatopáncreas con pinzas de disección sin dientes. 19
- Figura 5.** Músculos de camarones (*Litopenaeus vannamei*) juveniles alimentados con dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado. 19
- Figura 6.** Determinación de cenizas insolubles para el cálculo de la digestibilidad aparente de las dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado para el camarón *Litopenaeus vannamei* y de las heces colectadas durante el bioensayo. (a) Vasos de precipitado con muestra después de la ebullición con ácido clorhídrico al 2N. (b) Filtración al vacío utilizando un matraz Kitasato. (c) Muestra recuperada en el papel filtro dentro de una cápsula de porcelana previo a la calcinación. 20
- Figura 7.** Charolas de aluminio con muestras para la determinación de humedad en las dietas experimentales, músculos y heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei* colectados durante el bioensayo. 23

- Figura 8.** Muestras después de la calcinación en mufla a 550 °C para la determinación de cenizas en las dietas experimentales, músculo y heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei*, colectados durante el bioensayo. 23
- Figura 9.** Determinación de proteína cruda por el método de micro-Kjeldahl en las dietas experimentales, músculos y heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei* colectados durante el bioensayo. (a) Charolas de plástico con K₂SO₄, CuSO₄, 5H₂O pesados y muestra envuelta en papel para la etapa de digestión. (b) Etapa de digestión, matraces Kjeldahl en parrilla del digestor. (c) Etapa de destilación, destilador de micro-Kjeldahl. (d) Etapa de titulación. 25
- Figura 10.** Determinación de lípidos en las dietas experimentales y músculos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* colectados durante el bioensayo, utilizando el aparato de Soxhlet. 27
- Figura 11.** Determinación de fibra cruda de las dietas del bioensayo con juveniles de *Litopenaeus vannamei*. (a) Vasos de precipitado con muestra en plancha de calentamiento para la etapa de digestión. (b) Filtración de las muestras. (c) Pesaje del filtro después del secado. (d) Pesaje del filtro después de la calcinación. 28

RESUMEN

AMADOR ESQUIVEL AKETZALI. Uso de biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado en dietas para el camarón *Litopenaeus vannamei*: efectos en la digestibilidad aparente y desempeño de crecimiento (Bajo la dirección de: Dr. André Luiz Braga de Souza y M.C. Fernando Yahir García Gómez)

El objetivo de este estudio fue conocer los efectos del reemplazo, total (BRA) y parcial (BRB, BRM), de la harina de pescado (HP) por la biomasa residual de la biosíntesis de treonina (BR) en la digestibilidad aparente y en el desempeño de crecimiento de dietas de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Se utilizaron 60 juveniles de *L. vannamei* (4.9 ± 0.34 g) distribuidos en 12 tanques (cinco / tanque). Se evaluó la tasa de crecimiento específico, crecimiento semanal, tasa de conversión alimenticia, tasa de supervivencia, ganancia de peso, índice hepatosomático y digestibilidad aparente *in vivo*. El músculo del camarón se analizó para determinar su composición proximal. Los resultados mostraron que es posible reemplazar totalmente la HP por la BR sin afectar negativamente la digestibilidad aparente, por el contrario, se encontró que la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y de la proteína (DAP), de la BR de la dieta aumentaba cuando la proporción de HP y BR fue de 40:71.8 g/kg ($P < 0.05$). No hubo diferencias ($P > 0.05$) en el peso final, sobrevivencia, tasa de crecimiento específico, crecimiento semanal, tasa de conversión alimenticia, ni en el índice hepatosomático entre los diferentes grupos experimentales. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la composición del músculo de los camarones de todos los grupos experimentales. Los resultados demostraron que es posible el reemplazo de la harina de pescado parcial y total por la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en conjunto con otras fuentes de proteína de origen animal (harina de ave) y vegetal (gluten de maíz y soya) en dietas formuladas para juveniles de *L. vannamei* con un peso promedio inicial de 4.9 g (± 0.34 g) sin comprometer el crecimiento o la calidad nutricional del músculo, siendo las mayores tasas de digestibilidad de la dieta obtenidas cuando se usa en una proporción de 40 HP:71.8 BR g kg⁻¹.

Palabras clave: dietas acuícolas, digestibilidad *in vivo*, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

This study was carried out to determine the effects of diets where fishmeal (HP) was totally (BRA) or partially (BRB, BRM) replaced by residual biomass of threonine biosynthesis on apparent digestibility, growth performance of juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Sixty *L. vannamei* juveniles (4.9 ± 0.34 g) distributed in 12 tanks (five / tank) were used. Specific growth rate, weekly growth rate, feed conversion rate, survival rate, weight gain, hepatosomatic index, and apparent *in vivo* digestibility were measured. The chemical composition of the shrimp muscle was analyzed. The results showed that it is possible to replace HP with BR without negatively affecting the apparent digestibility. On the contrary, it was found that the apparent digestibility of dry matter (DAMS) and crude protein (DAP) increased when the ratio of HP and BR was 40: 71.8 g / kg ($P < 0.05$). This difference did not reflect in the growth performance since there were no differences ($P > 0.05$) in final weight, survival, specific growth rate, weekly growth, feed conversion rate, or hepatosomatic index between experimental groups. Nor were differences ($P > 0.05$) found in the muscle composition of the shrimp from the different experimental groups. The results indicate that it is possible to replace fishmeal with residual biomass from threonine biosynthesis in conjunction with other sources of protein of animal origin (poultry flour) and vegetable (corn gluten and soy) in diets formulated for *L. vannamei* juveniles with an initial average weight of 4.9 g (± 0.34 g) without affecting the growth or nutritional quality of the muscle, being the highest digestibility rates of the diet obtained when used in relation to 40 HP : 71.8 BR g / kg.

Key words: Aquafeeds, *In vivo* digestibility, *Litopenaeus vannamei*.

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícola, ganadera y pesquera han cubierto las necesidades alimentarias de la población a nivel mundial; sin embargo, esta necesidad crece cada año y no se puede resolver únicamente, con la intensificación de estas actividades, en especial con la sobreexplotación pesquera, puesto que se corre el riesgo de agotar las especies de interés alimentario y comercial (Cuéllar *et al.*, 2018). En respuesta a lo anterior, aunque la pesca sigue superando a la acuicultura en la producción acuícola-pesquera total, la brecha se está cerrando (Edwards *et al.*, 2019) y la acuicultura ya contribuyó con un 52% de la producción destinada al consumo humano en 2018 (FAO, 2020).

En México, la acuicultura ha alcanzado una tasa media anual de crecimiento de 15%; hay 9230 granjas registradas que representan 18% de la actividad pesquera del país (CONAPESCA, 2018; SADER, 2020). El crecimiento de la acuicultura en México, se debe en gran medida a la producción de camarón que es considerado una especie relevante para la seguridad alimentaria de la población y para el desarrollo económico nacional; además, constituye el segundo producto acuícola producido en el país con 158 115 toneladas, posicionando a México en el segundo lugar dentro de los mayores productores de América, sólo por debajo de Ecuador, y en el séptimo a nivel mundial (CONAPESCA, 2018; FAO, 2018).

Para mantener o inclusive incrementar la producción de camarones en México es necesario suministrar los insumos necesarios; entre estos, el más importante es la dieta ya que representa alrededor del 50% de los costos de producción (Molina y Villarreal, 2008). Por ello, los estudios de dietas que cubran eficientemente los requerimientos son fundamentales, resaltando a las proteínas como factor clave de la alimentación debido a su influencia en el crecimiento y a su relación directa con los costos de producción por la alta demanda y costo de almacenamiento de ingredientes proteínicos de las industrias pecuarias (Lee *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2003; Teshima *et al.*, 2006).

Una de las limitantes para el desarrollo de la camaronicultura relacionada con la nutrición está asociada a la alta demanda de harina de pescado (HP) necesaria para la formulación de dietas por ser este un ingrediente con una alta proporción de aminoácidos esenciales biodisponibles, es una buena fuente de macro y micro minerales y de vitaminas (García *et al.*, 2007). La producción de HP proviene principalmente de especies pelágicas, como la sardina. Sin embargo, la misma se ha tornado escasa y, consecuentemente, cara; el costo de la tonelada métrica se incrementó de 400 USD en el año 2000 a 1442.77 USD en el 2020 (Index Mundi, 2021). Por lo anterior, se sabe que la relación oferta/demanda no es sostenible y constituye un riesgo para la seguridad alimentaria (HLPE, 2014). La HP es un ingrediente que impacta el medio ambiente y será insostenible en el futuro al ser obtenido directamente de la pesca. Así, la investigación para sustituir la HP por ingredientes alternativos ha sido objetivo de investigación de muchos laboratorios.

A pesar de que existe una amplia variedad de fuentes alternativas de origen vegetal como la harina de soya, algodón, girasol, canola, *Leucaena* (Martínez *et al.*, 1999, Sanz *et al.*, 2000, González *et al.*, 2014) y de origen animal como harina de langostilla, desechos de almeja catarina, lombriz de tierra (Civera *et al.*, 1999), para sustituir o complementar la inclusión de la harina de pescado. Pero, algunos de estos ingredientes tienen las siguientes desventajas: bajo porcentaje de proteína y de aminoácidos esenciales, alto contenido de carbohidratos, presencia de contaminantes y de factores anti-nutricionales, baja palatabilidad, baja digestibilidad; por otra parte, algunos de ellos son altamente demandados por otras industrias, por lo que son poco disponibles, además, pueden ser de nula o baja sustentabilidad (Sanz *et al.*, 2000).

Por lo anterior, el uso de residuos como los obtenidos de la destilación y/o de fermentación bacteriana o de las levaduras pueden ser una alternativa (Qiu y Davis 2016, 2017). De estas opciones mencionadas, la industria de biosíntesis de aminoácidos (perteneciente a la industria de los suplementos alimenticios) ha crecido fuertemente debido a los cambios en el estilo de vida de las personas, ya

que sus dietas incluyen alimentos con alto contenido de energía (grasas, azúcares) e insuficientes niveles de frutas, hortalizas y fibra, lo que tiene efectos negativos sobre la salud al no satisfacer (Rapallo y Rivera, 2019), o exceder los requerimientos nutricionales. De acuerdo con la FAO (2021), en México en el año 2017, el 79.28% de las calorías consumidas fueron de origen vegetal y el 20.72% de origen animal; sin embargo, la digestibilidad y absorción de las proteínas de origen animal es de 90% mientras que la vegetal es sólo de 60 a 70% aproximadamente (González *et al.*, 2007), por lo tanto, el aporte de aminoácidos es insuficiente. Por ello se puede suponer que será necesaria una suplementación, sobre todo de los aminoácidos esenciales: leucina, isoleucina, valina, metionina, lisina, fenilalanina, triptófano, treonina, histidina y arginina (Martínez y Martínez, 2006). La necesidad de suplementar con aminoácidos esenciales las dietas explica la rápida expansión de la industria productora de estos nutrimentos; al mismo tiempo es un indicio de que en el corto, mediano y largo plazo, los residuos industriales estarán disponibles para las dietas acuícolas.

La biomasa residual obtenida tras la fermentación bacteriana (*Escherichia coli*) para la biosíntesis de treonina es una de las opciones más factible de aprovecharse en dietas acuícolas. Al final de ese proceso, se obtiene la treonina cristalizada y la biomasa residual que es rica en proteína cruda (PC, nitrógeno \times 6.25) y aminoácidos. De hecho, esa biomasa residual es más rica en los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina en comparación con los contenidos en la harina de pescado (Almeida *et al.*, 2014). Por lo anterior, el estudio de la inclusión de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en sustitución de la harina de pescado en dietas para camarones aportará datos en la búsqueda de ingredientes proteínicos alternativos.

1.1 Antecedentes

El primer reporte del uso de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina (BR) en dietas para animales fue elaborado por Almeida *et al.* (2014), quienes evaluaron su digestibilidad en lechones destetados. Estos autores encontraron que el

porcentaje de PC, aminoácidos totales y treonina, fueron mayores en la biomasa residual que en la harina de pescado; la digestibilidad ileal aparente para los aminoácidos esenciales (excepto del triptófano) y para los aminoácidos no esenciales (excepto glicina y prolina) fue mayor en la biomasa residual que en la harina de pescado. Aunado a esto, la digestibilidad ileal estandarizada de la PC y de todos los aminoácidos esenciales (excepto triptófano) y de los aminoácidos no esenciales (excepto prolina) fue también mayor en la biomasa residual que en la harina de pescado. Además de las digestibilidades evaluadas, se reportó que los lechones se mantuvieron sanos y consumieron fácilmente la dieta demostrando que no hubo dificultades con la palatabilidad.

Además, la BR ha sido probada en animales acuáticos por Rhodes *et al.* (2015) que trabajaron con Pámpano amarillo (*Trachinotus carolinus*) donde se encontró que se pueden usar hasta 128.2 g/kg en dietas prácticas para reemplazar totalmente la harina de pescado sin causar un rendimiento negativo en esta especie. En otro bioensayo realizado por Rosales *et al.* (2017) con corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) se obtuvo que las ganancias de peso aumentaron con la inclusión de 45 g/kg y 90 g/kg de la BR, pero disminuyó cuando se incluyeron 135 g/kg.

El uso de la BR ha sido también evaluado de forma conjunta con otros ingredientes proteínicos unicelulares. Burr *et al.* (2020) utilizaron la BR con un ingrediente de proteína proveniente de la fermentación de una levadura para medir el rendimiento del crecimiento en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Los datos que arrojaron sugieren que una tasa de inclusión por debajo de 80 g/kg es la óptima.

Asimismo, la BR ya fue probada en camarones blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) por Qiu y Davis (2017), donde evaluaron el efecto de dos presentaciones -de secado por aspersion y granular- de la BR. Los autores reportaron que la inclusión óptima para que no se vean afectados los parámetros de crecimiento, de ganancia de peso y tasa de conversión alimenticia fue de 50 g/kg para la BR secada por aspersion y de 120 g/kg de la BR granular; sin embargo, reportaron las mejores

ganancias de peso con una inclusión de 20 g/kg. Respecto a la composición del cuerpo entero, se describió que en los grupos que recibieron 120 g/kg de BR granular en la dieta, los camarones tuvieron un contenido de lípidos corporales significativamente más bajo que los alimentados con dietas que incluyeron 40 o 120 g/kg de la BR secada por aspersión.

El uso de la BR en dietas para animales en especial para los acuáticos es reciente; si bien, los estudios anteriores indicaron la pertinencia de su uso en dietas acuícolas, aún no se conocen los efectos de la sustitución total de la harina de pescado por la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en combinación con otras fuentes proteínicas de origen tanto animal como vegetal en la digestibilidad y crecimiento de juveniles del camarón *L. vannamei*.

1.2 Digestibilidad aparente *in vivo*

La digestibilidad es la capacidad de una especie para digerir y absorber los nutrientes de la dieta que ingiere (Gutiérrez *et al.*, 2009) y se calcula a través de la sustracción entre el total del alimento ingerido y la cantidad de heces totales producidas en un tiempo determinado (Fox y Lawrence, 2008), es indispensable conocer la digestibilidad para ofertar una nutrición óptima a las especies. Al utilizar materias primas con altos coeficientes de digestibilidad y limitar el uso de ingredientes con bajos coeficientes, se minimizarán las pérdidas de nutrientes (Vásquez, 2007) y de sólidos suspendidos en las heces, que, entre otros impactos, son potencialmente responsables de eutrofización y enterramiento de comunidades bentónicas en los ecosistemas receptores de los efluentes (Martínez *et al.*, 2009). Por lo tanto, es crítico conocer la digestibilidad de los ingredientes para la formulación de dietas eficientes y de mínimo costo (Fox y Lawrence, 2008).

Las heces también contienen cierta cantidad de nutrientes perdidos por la descamación del epitelio intestinal, esa cantidad es normalmente sustraída de la producción fecal para obtener una medida más precisa o “verdadera” de la digestibilidad; sin embargo, es difícil determinar de forma práctica estas pérdidas

con precisión. Por ello, la mayoría de los nutricionistas de organismos acuáticos valoran la digestibilidad aparente (donde la cantidad de nutrientes provenientes de la descamación intestinal no es considerada), que estima la digestibilidad del ingrediente (Fox y Lawrence, 2008).

Existen diversos métodos para evaluar la digestibilidad aparente de las proteínas en la dieta; los más utilizados son los métodos *in vivo*, y existen métodos *in vitro* que son alternativos. Dentro de la metodología *in vivo* existen el método indirecto y el directo. Para el método directo o cuantitativo, se requiere que, a partir de una cantidad de alimento conocida, se recupere la cantidad total de las heces excretadas; sin embargo, se tiene la dificultad de estimar con exactitud el consumo de alimento y de coleccionar la totalidad de las heces (Ricque *et al.*, 2008). En el método indirecto se utiliza un marcador inerte y, a diferencia del método directo, no se necesita conocer la cantidad exacta de alimento ingerido, tampoco es necesario recolectar el 100% de las heces (Ricque *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta las ventajas mencionadas, este método fue elegido para este estudio, utilizándose las cenizas insolubles en ácido como marcador debido a la practicidad y precisión con que pueden ser determinadas.

Por todo lo anterior el presente estudio busca contribuir a la búsqueda de ingredientes proteínicos alternativos a la harina de pescado evaluando la digestibilidad de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina mediante el método de digestibilidad aparente *in vivo*.

2. HIPÓTESIS

El uso de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina (BR) en sustitución de la harina de pescado en dietas formuladas para juveniles del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), no repercutirá negativamente en: 1) la digestibilidad aparente de la dieta y 2) El desempeño de crecimiento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la digestibilidad aparente y el desempeño de crecimiento (tasa de crecimiento específico, crecimiento semanal, tasa de conversión alimenticia) en juveniles del camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) alimentados con dietas formuladas con diferentes porcentajes de inclusión de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina con fuentes proteínicas de origen animal y vegetal como alternativa para la sustitución de la harina de pescado.

3.2 Objetivos específicos

- a. Evaluar los efectos de la sustitución gradual de la harina de pescado con una inclusión creciente de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en la digestibilidad aparente *in vivo* (materia seca y proteína).

- b. Evaluar parámetros de desempeño de crecimiento (tasa de crecimiento específico, crecimiento semanal, tasa de conversión alimenticia) de juveniles de camarón alimentados con dietas formuladas con diferentes porcentajes de inclusión de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en combinación con fuentes proteínicas de origen animal y vegetal para sustituir la harina de pescado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California y los protocolos experimentales tuvieron la aprobación de la Coordinación Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación de esta misma institución.

4.1 Acondicionamiento previo de los animales

Postlarvas de *Litopenaeus vannamei* ($n = 5000$) fueron obtenidas del laboratorio comercial Maricultura del Pacífico (Mazatlán, Sinaloa) y transportadas al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC), donde se les mantuvo en un sistema de recirculación compuesto por tres tanques de fibra de vidrio circulares de 1000 L cada uno, conectado a un sedimentador, reservorio, fraccionador de espuma y biofiltro. El sistema fue mantenido con aireación constante por medio de difusores de aire conectados a un soplador de 2.5 hp y a temperatura estable de 28 ± 1 °C con el uso de calentadores.

Además, los camarones en la etapa de mantenimiento se alojaron en las condiciones de calidad de agua recomendadas para su crecimiento (Wyban *et al.*, 1995; Van Wyk y Scarpa, 1999); es decir a una salinidad a 35 ppm, el oxígeno disuelto arriba de 5 mg/L, nitritos menos de 5 mg/L, amonio menor a 1 mg/L, pH de 7.5 a 8.5 y alcalinidad mayor a 130 mg CaCO₃ por L. Las condiciones de salinidad, oxígeno disuelto y temperatura fueron medidas dos veces al día, durante toda la duración del estudio, con un multiparámetro (Pro-2030 YSI®, Xylem Inc, EUA); mientras que nitritos y amonio fueron monitoreados semanalmente con un kit de pruebas colorimétricas (Api Saltwater Master®, Mars Inc., EUA); en tanto el pH fue medido con un potenciómetro (Thermo Scientific® Orion® 4-Star, Fisher Scientific, EUA) y para medir la alcalinidad se siguió una modificación de la metodología descrita por APHA (2012), donde se utilizó ácido sulfúrico 0.05 N y una solución indicadora compuesta de 100 mg de verde de bromocresol y 20 mg de rojo de metilo

en 100 mL de alcohol etílico para la titulación. Dos veces a la semana, se añadió en el reservorio una mezcla de agua dulce y salada (1:1), mientras que, una vez a la semana se agregaron 100 mg/L de bicarbonato de sodio de acuerdo con lo reportado por Furtado *et al.* (2015), para mantener la salinidad y alcalinidad, respectivamente dentro de los límites mencionados anteriormente.

En cuanto a la alimentación, se utilizaron dietas formuladas para satisfacer los requerimientos nutricionales de las diferentes fases (postlarvas, 45% de proteína cruda y 12% de lípidos; juveniles, 35% de proteína cruda y 10% de lípidos). Las dietas fueron preparadas en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva (IIO-UABC) y, se proporcionaron a los camarones cuatro veces al día, de acuerdo con lo establecido por Jory *et al.* (2001) hasta que alcanzaron el peso promedio de 5 g. En este punto, se eligieron aleatoriamente 60 animales y se dio inicio al periodo experimental.

4.2 Formulación y elaboración de dietas experimentales

La biomasa residual de la biosíntesis de treonina (BR) probada en este bioensayo fue utilizada como fuente proteínica alternativa a la harina de pescado. La composición proximal y el perfil de aminoácidos de la BR¹ se plasman en el Cuadro 1.

¹ Proplex® T, ADM® Animal Nutrition, EUA.

Cuadro 1. Composición proximal en base seca y perfil de aminoácidos de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina¹.

Composición proximal (g/kg)	
Humedad	83.70
Proteína cruda (N x 6.25)	790.82
Lípidos	80.80
Cenizas	65.72
ELN*	62.66
Perfil de aminoácidos (%) ²	
Arginina	5.11
Histidina	1.83
Isoleucina	4.15
Leucina	7.24
Lisina	5.20
Metionina	2.15
Fenilalanina	3.45
Treonina	4.52
Triptófano	1.06
Valina	5.10

*Extracto libre de nitrógeno; ELN (g/kg) = 1000 – (Proteína cruda + Lípidos totales + Cenizas).

¹ Proplex® T, ADM® Animal Nutrition, EUA

² Datos proporcionados por el fabricante

Cuatro dietas experimentales fueron formuladas usando la BR de acuerdo con los requerimientos nutricionales del camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) para obtener un 35% de proteína cruda. Además de la BR, se utilizaron como fuentes proteínicas harina de ave, harina de soya, harina de trigo, gluten de maíz, grenetina y harina de pescado. La diferencia clave entre las dietas fueron las proporciones entre harina de pescado y BR (HP:BR, g/kg), las cuales se establecieron de la siguiente manera:

- (1) 120:0 (control);
- (2) 80:35.9 (BRB, nivel de inclusión de la BR bajo);
- (3) 40:71.8 (BRM, nivel de inclusión de la BR medio);
- (4) 0:107.7 (BRA, nivel de inclusión de la BR alto).

La formulación y la composición proximal de las dietas experimentales se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Ingredientes y composición proximal en base seca de las dietas experimentales.

Ingredientes (g/kg)	Dietas experimentales			
	Control	BRB	BRM	BRA
Biomasa Residual de la biosíntesis de treonina ^a (BR)	0	35.9	71.8	107.7
Harina de pescado ^b	120	80	40	0
Harina de ave ^c	205	205	205	205
Harina de soya ^d	120	120	120	120
Harina de trigo ^e	180	180	180	180
Gluten de maíz ^f	20	20	20	20
Almidón ^g	211.5	213.8	215.9	218
Grenetina ^h	60	60	60	60
Sebo bovino ⁱ	20.2	22	24	26
Premezcla ^j	15.9	15.9	15.9	15.9
Fosfolípidos ^k	10	10	10	10
Colesterol ^l	5	5	5	5
DHA ^m	30	30	30	30
Benzoato de sodio ⁿ	2.3	2.3	2.3	2.3
BHT ⁿ	0.1	0.1	0.1	0.1
TOTAL	1000	1000	1000	1000
Composición proximal (g/kg)				
Proteína cruda (N x 6.25)	359.2	352.5	350.2	344.9
Lípidos	72.8	72.1	82.9	79.1
Cenizas	71.1	66.2	61.4	56.3
Fibra	33.0	39.0	38.0	32.0
ELN*	452.6	470.2	467.5	488.7

*Extracto libre de nitrógeno; ELN (g kg⁻¹) = 1000 – (Proteína cruda + Lípidos totales + Fibra + Cenizas).

^a Proplex[®] T, ADM[®] Animal Nutrition. ^b ED & F MAN LIQUID PRODUCTS S.A. de C.V. ^c Scoular de México S. de R.L. de C.V. ^d Alimentos COLPAC. ^e Molinera del valle S.A. de C.V. ^f Ingredion México S.A. de C.V. ^g Tate & Lyle - Heartland Consumer Products LLC. ^h Progel Mexicana[®]. ⁱ industrial de Grasas y Derivado, Tijuana BC, México. ^j Rovimix, DSM Nutritional Products México S.A. de C.V., contiene en g/kg: ácido p-aminobenzoico 1.45; biotina 0.02; mioinositol 14.5; ácido nicotínico 2.9; Capantotenate 1.0; piridoxina-HCl 0.17; riboflavina 0.73; tiamina-HCl 0.22; menadiona 0.17; α-tocoferol 1.45; cianocobalamina 0.0003; calciferol 0.03; L-ascorbil-2-fosfato-Mg 0.25; ácido fólico 0.05; cloruro de colina 29.65; retinol 0.015; NaCl 1.838; MgSO₄ 7H₂O 6.85; NaH₂PO₄ 2H₂O 4.36; KH₂PO₄ 11.99; Ca(H₂PO₄)₂ 2H₂O 6.79; Fe-citrato 1.48; Ca-lactato 16.35; AlCl₃ 6H₂O 0.009; ZnSO₄ 7H₂O 0.17; CuCl₂ 0.0005; MnSO₄ 4H₂O 0.04; KI 0.008; CoCl₂ 0.05 y Stay - C (vitamina C).

^k Comercializador Costa bella S. de R.L. de C.V., Ensenada BC, México. ^l Cholesterol, NF, MP Biomedicals, California, Estados Unidos. ^m Natur[™], ADM[®] Animal Nutrition. ⁿ Interquímica SA de CV, Atizapán de Zaragoza, México.

Para la elaboración de las dietas experimentales, se siguió el procedimiento (Mata *et al.*, 2018) del Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva (IIO-UABC). Inicialmente, se calcularon y pesaron los ingredientes para preparar 1 kg de cada dieta, dividiéndolos en microingredientes (premezcla, fosfolípidos, colesterol, DHA, benzoato de sodio y BHT) y en macroingredientes (BR, harinas de pescado, ave, soya y trigo y gluten de maíz). El almidón, la grenetina y el sebo bovino se pesaron por separado. Se mezclaron los micro y macroingredientes durante 1:20 minutos en una mezcladora de corte vertical R60 (Robot-coupe[®], Robot Coupe USA, EUA). El almidón se preparó diluyéndolo, en agua caliente en proporción 1:1, y cociéndolo en microondas, después se incorporó a el contenido de la mezcladora; la grenetina se preparó con agua caliente en una proporción 2:1, aún líquida se agregó a la mezcla previa y el sebo se incorporó caliente y fundido a la mezcla. La masa resultante se colocó en la peletizadora que produjo tiras de 2.0 mm de diámetro, que se colocaron en bandejas de metal para su enfriamiento. Una vez frías, se cortaron en una mezcladora de corte vertical R15 (Robot-coupe[®], Robot Coupe USA, EUA) hasta que se obtuvo partículas de 1 cm de largo. Después, los pellets resultantes se colocaron en bandejas de plástico y se introdujeron en estufa horizontal con ventilación (1600 HAFO series, VWR INTERNATIONAL[®], avantor[™], EUA) a 60 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron del horno y se dejaron enfriar a temperatura ambiente previo al envasado en botes de plástico identificados. Para su conservación, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante todo el experimento (Fig. 1).



Figura 1. Proceso de preparación de las dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado para el camarón *Litopenaeus vannamei*. (a) Pesaje. (b) Mezclado de ingredientes en una mezcladora de corte vertical. Preparación de (c) almidón; (d) grenetina. Masa en extrusor (e) saliendo y (f) dentro. Pellets (g) corte; (h) enfriado después del secado. (i) Envasado de las dietas.

4.3 Diseño experimental

Se llevó a cabo un bioensayo realizado en un sistema de recirculación (Fig. 2) compuesto de un biofiltro conectado a 12 tanques de 20 L llenados con agua de mar, proveniente del reservorio del IIO-UABC, en el que se colocaron de forma aleatoria 5 organismos con un peso promedio de 4.9 g (± 0.34 g SD) en cada uno de los tanques.

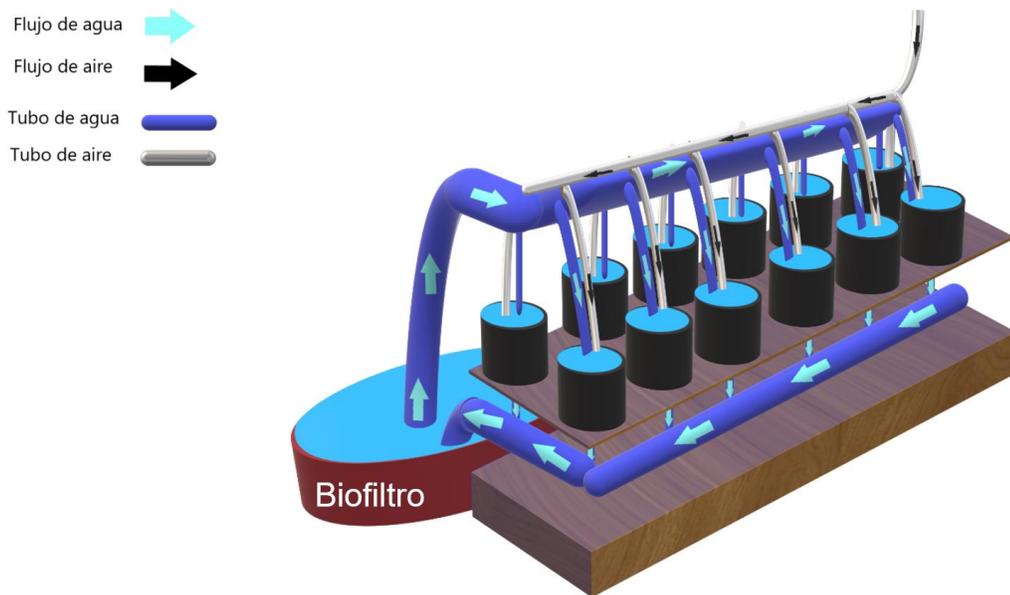


Figura 2. Sistema de recirculación para el bioensayo con juveniles de *Litopenaeus vannamei*, conformado por los 12 tanques ilustrados de color negro y un biofiltro.

El bioensayo tuvo una duración de 42 días utilizando un diseño completamente al azar con 4 grupos experimentales por triplicado. Cada grupo correspondió a una de las dietas experimentales. La asignación de dieta por tanque también fue aleatoria.

Los camarones se alimentaron con el 8% de su biomasa repartido en cuatro porciones iguales al día (9:00, 11:30, 14:00 y 16:30 h). La calidad de agua se monitoreó midiendo dos veces al día la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, mientras que nitritos, amonio, pH y alcalinidad se midieron una vez por semana. Los métodos utilizados para medir y corregir las condiciones ambientales, asimismo los

rangos dentro de los cuales ellas fueron mantenidos durante el bioensayo, fueron descritos en la subsección 4.1.

4.4 Desempeño de crecimiento

Una vez terminado el experimento, los camarones de cada tanque se contaron y pesaron de forma individual. El desempeño de crecimiento se evaluó mediante el cálculo de las siguientes variables de acuerdo con las siguientes fórmulas:

- Tasa de crecimiento específico (SGR, de su sigla en inglés)
$$\text{SGR (\%/día)} = [\text{Ln (peso final)} - \text{Ln (peso inicial)}] \times 100 / \text{días de experimento};$$
- Crecimiento semanal (CS)
$$\text{CS (g/semana)} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{semanas};$$
- Tasa de conversión alimenticia (TCA)
$$\text{TCA} = \text{total de alimento ofertado} / \text{biomasa de camarón producida};$$
- Tasa de sobrevivencia (SR)
$$\text{SR (\%)} = \text{número final de camarones} \times 100 / \text{número inicial de camarones}.$$

4.5 Recolecta de muestras

4.5.1 Heces

Para la determinación de la digestibilidad *in vivo*, se colectaron diariamente heces de cada tanque. Esta recolección empezó una semana después del inicio del bioensayo para asegurar que las heces fueran el resultado de la digestión de las dietas experimentales (Fenucci, 2008). Con el fin de evitar la recolección de heces degradadas, residuos de heces y alimentos del día anterior. Éstos fueron retirados diariamente, por sifoneo antes de la primera alimentación.

La colecta se realizó dos horas después de las alimentaciones de 9:00, 11:30 y 14:00 h también por medio de sifoneo del tanque, de acuerdo con la metodología descrita por Cruz *et al.* (2008). Para ello, el agua recolectada por sifoneo se tamizó con el fin de coleccionar los hilos fecales, los cuales fueron enjuagados con agua destilada y después colocados en tubos eppendorf® y conservados a -18 °C (Fig. 3).



Figura 3. Recolección de heces para calcular la digestibilidad aparente de dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado para el camarón *Litopenaeus vannamei*. (a) Material utilizado en la colecta de heces: criba, pipeta Pasteur y tubos Eppendorf®. (b) Hilos fecales en la criba lavados con agua destilada. (c) Heces en tubos Eppendorf® para congelación.

4.5.2 Hepatopáncreas

Para la recolección de hepatopáncreas se efectuó la eutanasia de los animales por hipotermia inducida por crioadestesia de acuerdo con lo establecido por el Coordinador Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del IIO-UABC. Una vez listos los especímenes, se colectaron los hepatopáncreas retirando el exoesqueleto del cefalotórax (Fig. 4a) y tomando los órganos con pinzas de disección sin dientes (Fig. 4b), los hepatopáncreas se pesaron para calcular el índice hepatosomático (IHS) con la siguiente fórmula:

$$\text{IHS} = \frac{\text{peso hepatopancreas}}{\text{peso de camarón entero}} \times 100$$

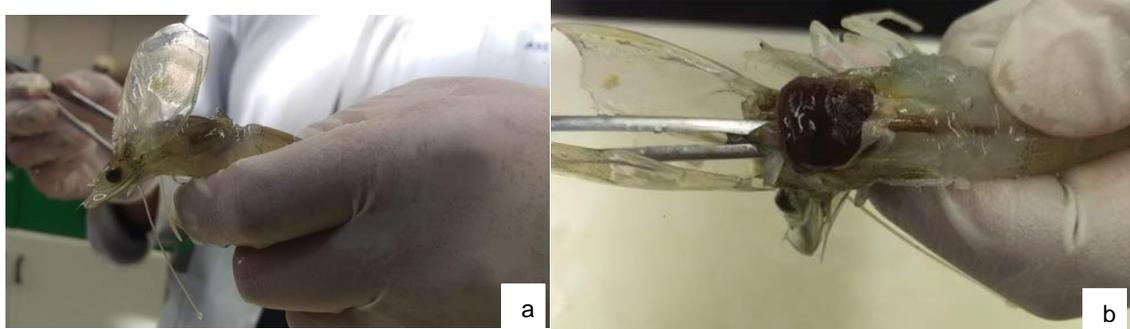


Figura 4. Recolección de hepatopáncreas pertenecientes a camarones (*Litopenaeus vannamei*) juveniles alimentados con dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado. (a) Retiro del exoesqueleto del cefalotórax. (b) Extracción del hepatopáncreas con pinzas de disección sin dientes.

4.5.3 Músculo

Después de la recolección del hepatopáncreas, se tomó por disección, la muestra de músculo, la cual fue puesta en una cápsula de porcelana para su machacado y deshidratado para su posterior análisis de composición proximal (Fig. 5).



Figura 5. Músculos de camarones (*Litopenaeus vannamei*) juveniles alimentados con dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado.

4.6 Digestibilidad aparente *in vivo*

Al finalizar el experimento, se determinó el contenido de cenizas insolubles en ácido de las dietas experimentales y de las heces colectadas durante el bioensayo para calcular la digestibilidad aparente de acuerdo con lo descrito por la AOAC (2015) y Cruz *et al.* (2009). Los análisis fueron realizados por triplicado. Inicialmente, filtros (Whatman®) de fibra de vidrio GF-F de 47 mm de diámetro fueron lavados con 1.5 mL de diclorometano usando una jeringa de vidrio, en seguida fueron secados a temperatura ambiente. Los filtros secos fueron calcinados en un crisol de porcelana a 450 °C durante cinco horas. Una vez calcinados, se dejaron enfriar los crisoles en desecadores por 20 minutos y se pesaron.

Aparte de la preparación de los filtros, 50 mg de cada muestra (dietas o heces) previamente seca y calcinada se pesaron en un vaso de precipitado de 50 mL. Una vez pesadas las muestras, se agregaron 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 2 N escurriéndolo por las paredes del vaso para incluir toda la muestra. Se taparon los vasos de precipitado con vidrios de reloj y se calentaron en planchas eléctricas dentro de la campana de extracción hasta alcanzar la ebullición. Finalizada la ebullición, se dejaron enfriar por 5 minutos dentro de la campana (Fig. 6a).

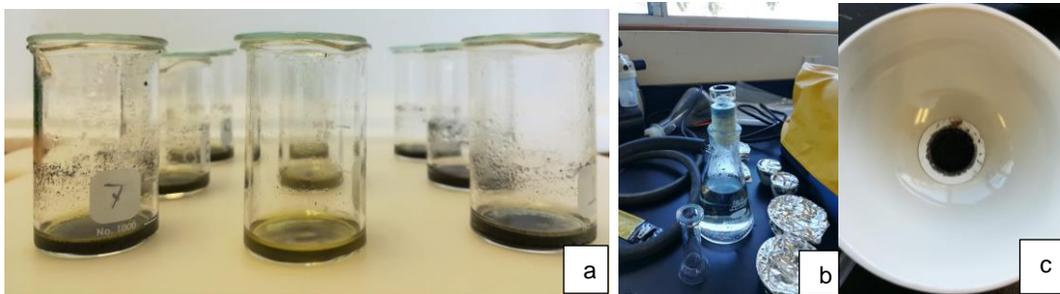


Figura 6. Determinación de cenizas insolubles para el cálculo de la digestibilidad aparente de las dietas formuladas con biomasa residual de la biosíntesis de treonina como fuente de proteína alternativa a la harina de pescado para el camarón *Litopenaeus vannamei* y de las heces colectadas durante el bioensayo. (a) Vasos de precipitado con muestra después de la ebullición con ácido clorhídrico al 2N. (b) Filtración al vacío utilizando un matraz Kitasato. (c) Muestra recuperada en el papel filtro dentro de una cápsula de porcelana previo a la calcinación.

Transcurridos los 5 minutos, se filtró el contenido de los vasos de precipitado los filtros preparados previamente utilizando un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío (Fig. 6b). Durante la filtración, el vaso de precipitado se enjuagó con agua destilada caliente para asegurar la recuperación de toda la muestra en el filtro. Al terminar los enjuagues, se retiró el filtro, que se colocó en una cápsula de porcelana y se calcinó en la mufla a 450 °C durante cinco horas (Fig. 6c). Tras la calcinación, las cápsulas se dejaron enfriar dentro del desecador por 20 minutos y se pesaron.

Para calcular las cenizas insolubles en ácido se utilizó la siguiente formula:

$$\%CI = \frac{Cen * \left(\frac{PFF - PIF}{PM} \times 100 \right)}{100}$$

Donde:

CI = Cenizas insolubles en ácido;

Cen = Cenizas de muestra;

PFF = Peso final del filtro;

PIF = Peso inicial del filtro;

PM = Peso de muestra.

Los datos de las cenizas insolubles en ácido se utilizaron para el cálculo de la digestibilidad aparente de la materia seca de la dieta (DAMS) y de la proteína en la dieta (DAP) con las siguientes formulas:

$$DAMS = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% CID}{\% CIH} \right) \right]$$

$$DAP = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% PH}{\% PD} \right) \times \left(\frac{\% CID}{\% CIH} \right) \right]$$

Donde:

DAMS = Digestibilidad aparente de materia seca;

DAP = Digestibilidad aparente de proteína cruda;

%PH = Porcentaje de proteína cruda en heces;

%PD = Porcentaje de proteína cruda en dieta;

%CID = Cenizas insolubles en acido de dieta;

%CIH = Cenizas insolubles en acido de heces.

Con los datos anteriores se calculó el coeficiente de la digestibilidad de la proteína cruda de la BR con la siguiente formula:

$$DAI = DADE + \left[(DADE - DADR) \times \left(\frac{0.7 \times \%DR}{0.3 \times \%DE} \right) \right]$$

Donde:

DAI = Digestibilidad aparente del ingrediente;

DADE = Digestibilidad aparente de la dieta a evaluar;

DADR = Digestibilidad aparente de la dieta de referencia;

%DR = %nutriente de la dieta de referencia;

%DE = %nutriente del ingrediente a evaluar.

4.7 Análisis de composición proximal

Los análisis proximales de las dietas y músculos de los juveniles de *L. vannamei*, incluyeron humedad, cenizas, proteína y lípidos. En las heces se determinó el contenido de humedad, cenizas y proteína. Además, en las dietas, se determinó el contenido de fibra. Los análisis se realizaron por triplicado, de acuerdo con las metodologías descritas por la AOAC (2015).

4.7.1 Humedad

La humedad se determinó por el método gravimétrico. Para ello, 2 g de muestra se pesaron en charolas de aluminio y se secaron en horno de convección a 60 °C por 24 horas o hasta peso constante (Fig. 7). Una vez secas, se sacaron del horno y se dejaron enfriar en un desecador por 20 minutos, para evitar que adquiriera humedad del ambiente. Una vez frías, las muestras se pesaron para calcular la humedad con la siguiente formula:

$$\%H = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$



Figura 7. Charolas de aluminio con muestras para la determinación de humedad en las dietas experimentales, músculos y heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei* colectados durante el bioensayo.

4.7.2 Cenizas

Las cenizas se determinaron por el método gravimétrico de calcinación. Se pesó 1 g de muestra seca en una cápsula de porcelana y se calcinó en una mufla a 550 °C por seis horas (Fig. 8).



Figura 8. Muestras después de la calcinación en mufla a 550 °C para la determinación de cenizas en las dietas experimentales, músculo y heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei*, colectados durante el bioensayo.

Una vez calcinadas las muestras, se dejaron enfriar en un desecador por 20 minutos y, por último, se pesaron. El porcentaje de cenizas se calculó con la siguiente fórmula:

$$x\%Cenizas = \frac{Peso\ final \times 100}{Peso\ inicial}$$

4.7.3 Proteína cruda

La proteína cruda se determinó con el método de micro-Kjeldahl, el cual mide la cantidad de nitrógeno presente en la muestra y se calcula de forma indirecta multiplicando el resultado por el factor de conversión de nitrógeno 6.25 (AOAC 2015). El método se compone de tres etapas: digestión, destilación y titulación. Antes de comenzar la digestión, se preparó la muestra a digerir que consistió en pesar 2 g de sulfato de potasio (K_2SO_4), para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico, 40 mg de sulfato cúprico pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), que tiene la función de catalizador, y 50 mg de muestra seca a analizar (Fig. 9a). Además de las muestras, fue necesario utilizar un blanco, que consistió en K_2SO_4 y el $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ solos, los cuales fueron procesados igual como si tuviera una muestra.

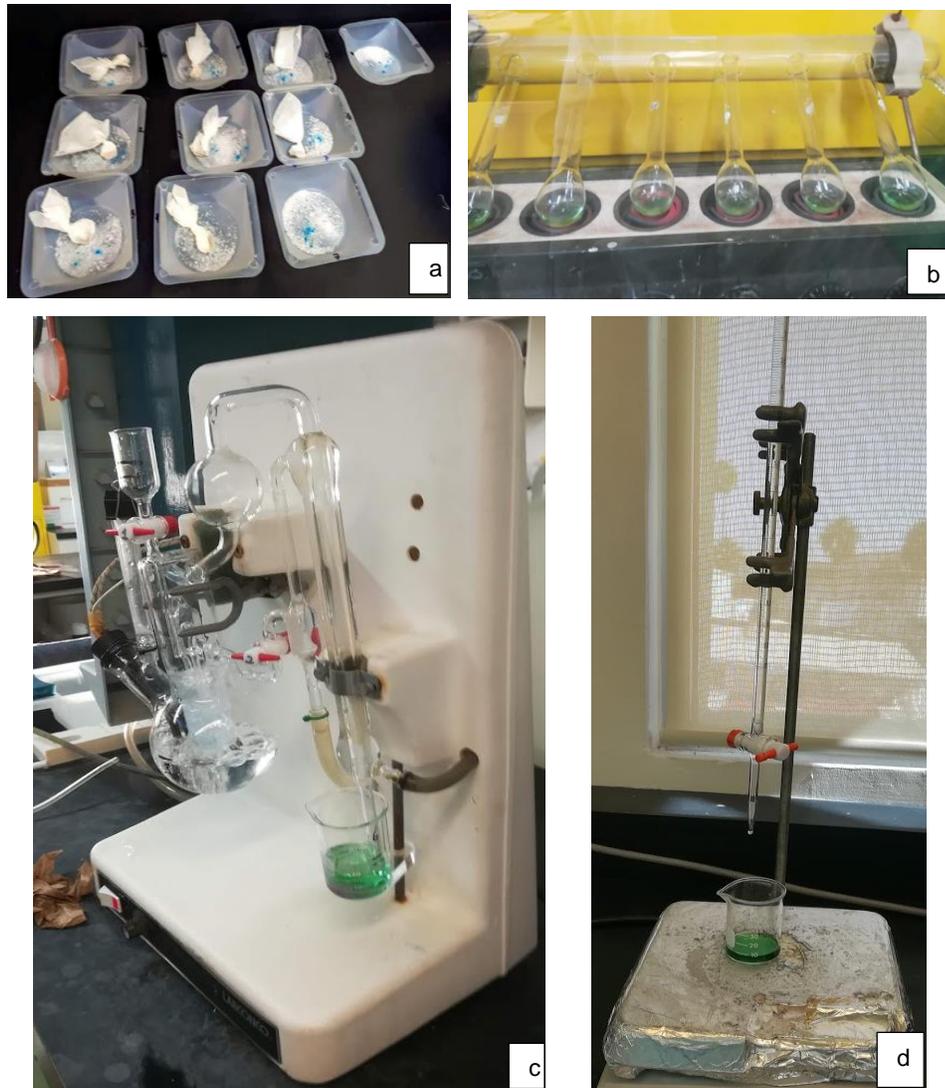


Figura 9. Determinación de proteína cruda por el método de micro-Kjeldahl en las dietas experimentales, músculos y heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei* colectados durante el bioensayo. (a) Charolas de plástico con K_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ pesados y muestra envuelta en papel para la etapa de digestión. (b) Etapa de digestión, matraces Kjeldahl en parrilla del digestor. (c) Etapa de destilación, destilador de micro-Kjeldahl. (d) Etapa de titulación.

La muestra y los reactivos pesados se colocaron en un matraz de Kjeldahl de 30 mL, se agregaron 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) ACS 97.4% y se colocó el matraz en la parrilla del digestor (Fig. 9b). La digestión comenzó en el momento en que se empezaron a calentar los matraces gradualmente hasta la ebullición del ácido

sulfúrico, cuando la muestra se tornó transparente se dejó 15 minutos más. Todo el proceso de digestión duró aproximadamente cuatro horas.

Finalizada la digestión, los matraces se dejaron enfriar y se les añadieron 25 mL de agua destilada. En un vaso de precipitado se prepararon 15 mL de ácido bórico al 3%, con 5 gotas de indicador de Shiro Tashiro, y se colocó en la salida del destilador (Fig. 9c). En seguida, se añadieron 5 mL de muestra, 10 mL de hidróxido de sodio al 40% y 10 mL de agua destilada al destilador, se encendió el equipamiento, iniciando la destilación mediante el encendido del destilador. El proceso concluyó cuando se colectaron 50 mL de la muestra, para iniciar la titulación (Fig. 9d), que se realizó con ácido clorhídrico (HCL) 0.02 N, previamente valorado con carbonato de sodio 10.016 mg/mL.

Para el cálculo del porcentaje de proteína cruda se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(\text{ml de HCl} - \text{ml de blanco}) \times \text{normalidad de HCl} \times 1.4 \text{ g de muestra}}{\text{muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

4.7.4 Lípidos

Para determinar los lípidos se utilizó el método gravimétrico de extracción de lípidos en un aparato de Soxhlet. Ese consiste en la extracción de los lípidos mediante lixiviación de la muestra usando disolventes como el éter de petróleo. Previamente al procedimiento, se pesaron los matraces en donde posteriormente fue añadido el éter de petróleo. Se pesaron 2 g de muestra seca en cartuchos fabricados con papel filtro, y este, a su vez, fue colocado en el sifón del extractor Soxhlet, prendiéndose la plancha de calentamiento (Fig. 10).



Figura 10. Determinación de lípidos en las dietas experimentales y músculos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* colectados durante el bioensayo, utilizando el aparato de Soxhlet.

Las muestras se procesaron durante cuatro horas, cuando la plancha se apagó y los matraces fueron retirados y acondicionados en estufa a 60 °C hasta la completa evaporación del disolvente residual. Una vez fríos, los matraces se pesaron y se calculó el porcentaje de lípidos con la siguiente formula:

$$\%Lípidos = \frac{(\text{peso final matraz} - \text{peso inicial matraz}) \times 100}{\text{Peso muestra}}$$

4.7.5 Fibra cruda

El método para determinar la fibra cruda consistió en cuantificar la pérdida por calcinación del residuo de las digestiones ácida y alcalina de las muestras. Previo a las digestiones, las muestras fueron desgrasadas (ver 4.7.4) y secadas. En seguida, se pesaron 200 mg de cada muestra en un vaso de precipitado de 30 mL; para la digestión ácida, se añadieron a la muestra 15 mL de ácido sulfúrico al 1.25%, se taparon con un vidrio de reloj y se llevaron a calentamiento en una plancha (Fig. 11a). Se dejó hervir por 15 minutos hasta que se digirió toda la muestra y, después, se dejó enfriar por otros 15 minutos, la muestra se sedimentó y el sobrenadante se filtró en un papel filtro Whatman #1 con el fin de recuperar toda la muestra para la digestión alcalina. La recuperación de la muestra se llevó a cabo mediante el lavado

del filtro con 20 mL hidróxido de sodio al 1.25% dejando que escurriera en el vaso de precipitado con la muestra restante. Una vez recuperada la muestra, se colocó nuevamente el vaso de precipitado en la plancha de calentamiento, dejando hervir la muestra con el hidróxido de sodio por 15 minutos.

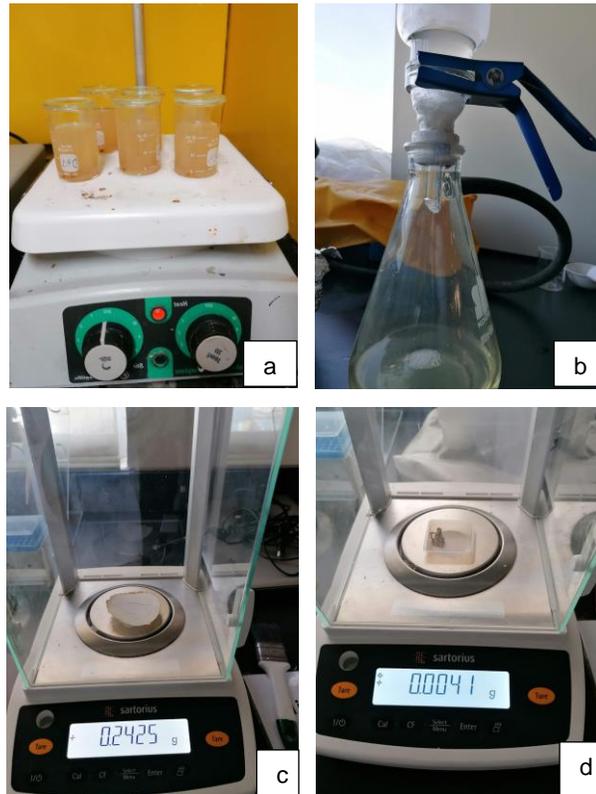


Figura 11. Determinación de fibra cruda de las dietas del bioensayo con juveniles de *Litopenaeus vannamei*. (a) Vasos de precipitado con muestra en plancha de calentamiento para la etapa de digestión. (b) Filtración de las muestras. (c) Pesaje del filtro después del secado. (d) Pesaje del filtro después de la calcinación.

Finalizada la digestión alcalina, se volvieron a filtrar las muestras en un papel Whatman #1. Durante el filtrado, se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico, en seguida tres porciones de 30 mL de agua destilada caliente y por último 8 mL de alcohol etílico. El filtro se colocó en un crisol y se tapó con papel aluminio para ponerlo a secar a 130 °C por dos horas. Finalizado el tiempo de secado, se pesó el filtro (Fig. 11c) y se metió a calcinar a 550 °C, después se sacaron de la mufla, se dejaron enfriar y se pesaron (Fig. 11d) para calcular la fibra con la siguiente formula:

$$\%Fibra\ cruda\ en\ muestra\ seca\ y\ desengrasada = C$$

$$C = \frac{(\text{peso del filtro con residuo seco} - \text{peso despues de la calcinacion}) \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\%FC = \%Fibra\ cruda\ en\ muestra\ original$$

$$\%FC = \frac{C (100 - \% humedad - \% grasa\ cruda)}{100}$$

4.8 Análisis estadísticos

Previo a los análisis estadísticos, los datos en porcentaje fueron transformados en arcoseno de la raíz cuadrada. Pero sólo los valores no transformados son presentados en este trabajo. Para analizar los datos fue utilizado el software Sigma Stat 4.0[®], en el cual se realizaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene), como requisito para realizar el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para identificar diferencias estadísticas entre los grupos experimentales; cuando se observaron diferencias se realizó la prueba *posthoc* de Tukey. La significancia se fijó a $P < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Digestibilidad aparente

En el Cuadro 3 se muestran los porcentajes de digestibilidad aparente de la biomasa residual y de las dietas experimentales donde se utilizó en sustitución de harina de pescado. La digestibilidad de la proteína de BR fue mayor ($P < 0.05$) en la dieta BRM en comparación con la dieta BRB; mientras que el tratamiento BRA no mostro diferencias en comparación con los demás tratamientos. En la digestibilidad de la proteína de la dieta, BRM fue mayor ($P < 0.05$) en comparación a las dietas control y BRB, mientras que la dieta BRA no mostró diferencias con las demás dietas. Al comparar las digestibilidades de la materia seca de las dietas experimentales, la dieta BRM presentó los mayores ($P < 0.05$) valores en comparación con los otros grupos experimentales, incluso con el grupo control que no incluyó BR como uno de sus ingredientes.

Cuadro 3. Digestibilidad ($\% \pm SD$) aparente *in vivo* de la materia seca (MS) y la proteína de la biomasa residual (BR) de la síntesis de treonina y de dietas experimentales para juveniles de *Litopenaeus vannamei* utilizando BR en sustitución de harina de pescado

	Digestibilidad (%) de dietas experimentales ¹				Valor de P
	Control	BRB	BRM	BRA	
Proteína de BR	-	88.4 \pm 3.6 ^b	96.4 \pm 0.8 ^a	92.2 \pm 0.6 ^{ab}	0.013
MS de dietas	86.4 \pm 1.5 ^b	86.9 \pm 1.4 ^b	91.7 \pm 0.5 ^a	88.4 \pm 0.6 ^b	0.002
Proteína de dietas	89.5 \pm 1.2 ^b	88.9 \pm 1.7 ^b	92.9 \pm 0.4 ^a	90.8 \pm 0.2 ^{ab}	0.012

^{a,b} Literales diferentes en la misma hilera indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

¹ Control, 0; BRB, 35.9; BRM, 71.8 y BRA, 107.7 g de BR / kg de dieta.

5.2 Desempeño de crecimiento e índice hepatosomático

Los resultados para desempeño de crecimiento e índice hepatosómico se presentan en el Cuadro 4. No hubo diferencias ($P>0.05$) para estas variables.

Cuadro 4. Variables de desempeño de crecimiento (media \pm SD) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas formuladas con biomasa residual (BR) de la síntesis de treonina en sustitución de haría de pescado.

Variable	Dietas experimentales ¹				Valor de P
	Control	BRB	BRM	BRA	
<i>Desempeño de crecimiento</i>					
Peso final (g)	8.9 \pm 0.5	8.9 \pm 0.2	8.6 \pm 0.8	8.5 \pm 0.2	0.718
Sobrevivencia (%)	100.0 \pm 0.0	93.3 \pm 11.5	73.3 \pm 30.5	93.3 \pm 11.5	0.330
SGR (%/día) ²	1.4 \pm 0.1	1.4 \pm 0.05	1.3 \pm 0.2	1.3 \pm 0.06	0.709
CS (g/semana) ³	0.66 \pm 0.08	0.66 \pm 0.03	0.61 \pm 0.14	0.60 \pm 0.03	0.718
TCA ⁴	1.30 \pm 0.15	1.38 \pm 0.19	1.83 \pm 0.65	1.30 \pm 0.32	0.541
IHS ⁵	3.83 \pm 0.06	3.85 \pm 0.17	3.89 \pm 0.58	3.69 \pm 0.69	0.720

¹ Control, 0; BRB, 35.9; BRM, 71.8 y BRA, 107.7 g de BR / kg de dieta.

² SGR, tasa de crecimiento específico (de sus siglas en inglés).

³ CS, crecimiento semanal.

⁴ TCA, tasa de conversión alimenticia (g de alimento ofertado/g de biomasa de camarón producida).

⁵ IHS, índice hepatosomático.

5.3 Composición proximal del músculo

La composición proximal del músculo se muestra en el Cuadro 5. No hubo diferencias ($P>0.05$) entre los grupos experimentales.

Cuadro 5. Composición proximal (g/kg de materia seca \pm SD) del músculo de juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas formuladas con biomasa residual (BR) de la síntesis de treonina en sustitución de harina de pescado.

	Dietas experimentales ¹				Valor de P
	Control	BRB	BRM	BRA	
Humedad	728.60 \pm 5.03	727.07 \pm 3.86	729.41 \pm 12.54	735.38 \pm 12.33	0.721
PC ² (N \times 6.25)	891.88 \pm 17.39	892.23 \pm 45.78	894.30 \pm 32.31	875.19 \pm 18.77	0.860
Lípidos	38.35 \pm 10.59	40.80 \pm 10.24	35.28 \pm 9.31	42.37 \pm 10.86	0.721
Cenizas	65.15 \pm 2.4	70.28 \pm 5.1	72.90 \pm 3.94	66.98 \pm 6.06	0.246

¹ Control, 0; BRB, 35.9; BRM, 71.8 y BRA, 107.7; g/kg de dieta.

² Proteína cruda.

6. DISCUSIÓN

La sustitución de harina de pescado por biomasa residual de la biosíntesis de treonina (BR) no afectó negativamente el desempeño de crecimiento, el índice hepatosomático ni la composición proximal del músculo de los juveniles de *L. vannamei*. Sin embargo, las proporciones evaluadas de la BR y harina de pescado sí afectaron la digestibilidad aparente *in vivo*, siendo el ingrediente y la dieta más digestibles cuando la relación HP:BR fue de 40:71.8 g/kg de dieta. Independiente de lo anterior, en este estudio la digestibilidad fue mayor al 90% tanto de las dietas como del ingrediente, lo que apoya la posibilidad de que incluir la BR como un ingrediente en dietas para camarones.

La biomasa residual de la síntesis de treonina ya se encuentra disponible en el mercado como un producto comercial; sin embargo, los resultados de digestibilidad generados en el presente estudio son por el momento, los primeros para el uso de BR en las dietas de camarones. Estos resultados contribuyen a la búsqueda de nuevas fuentes proteínicas para dietas acuícolas, ya que, para utilizar un nuevo ingrediente en la formulación de dietas destinada a la acuicultura, en remplazo a otras fuentes convencionales y eficientes como la harina de pescado, es indispensable analizar su composición química y su digestibilidad (Glencross *et al.*, 2007).

Conocer la digestibilidad de un ingrediente o de una dieta es esencial para lograr formulaciones que cubran los requerimientos nutricionales, que a la vez permitan, una sustitución por costo de ingredientes; y además favorezcan la reducción del impacto ambiental al disminuir la eliminación y desperdicio de nutrientes (Velasco *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Fox y Lawrence, 2008). Las pruebas de digestibilidad son herramientas valiosas para encontrar una formulación que permita el máximo aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Por lo anterior y teniendo en cuenta la recomendación hecha por Turchini *et al.* (2019), se buscó probar la BR de una

manera integradora, holística y multifactorial al mezclarla con fuentes de proteína tanto de origen animal como vegetal cuyo uso es factible en escala industrial en el mundo y en México.

Teniendo en cuenta que desde hace mucho se sabe que la mezcla de ingredientes de diversos orígenes afecta la digestibilidad (Akiyama, 1989), los resultados reportados en este trabajo son exitosos al indicar la óptima mezcla (en términos de digestibilidad) de la BR con otras fuentes proteínicas de origen vegetal y animal con el objetivo de sustituir la harina de pescado. De acuerdo con estos resultados, se observó que los camarones aprovecharon mejor el contenido total (materia seca) y de proteínas del ingrediente y de la propia dieta cuando se utilizó una cantidad de 40 g/kg de dieta de harina de pescado y una inclusión de 71.8 g/kg de dieta de la BR, en comparación con la dieta control formulada sin BR y con harina de pescado.

Sin embargo, para una adecuada interpretación y uso de los datos de digestibilidad se deben de considerar los factores intrínsecos y extrínsecos a la dieta que pueden afectar su digestibilidad. Los principales factores intrínsecos son: la técnica de extrusión (Davis y Arnold, 1995); la fuente y porcentaje de inclusión de la proteína, lo que influye directamente en la actividad enzimática (Chuang, 1985, citado en Fox y Lawrence, 2008; Córdova *et al.*, 2002); y la formulación, pues según Akiyama (1989) dietas nutricionalmente incompletas suelen resultar en una baja digestibilidad. Entre los factores extrínsecos que afectan la digestibilidad de la dieta están:

(1) Talla de los animales – de acuerdo con lo reportado por Gamboa *et al.* (2003), la actividad de la amilasa se duplica en camarones que excedieron los 2 g de peso. A los 6 g, la actividad de la tripsina repunta, mientras la actividad total de las proteasas disminuye cuando el peso de los camarones es de 6 g o más. Basado en el anterior, los autores sugieren la existencia de una adaptación de la actividad enzimática a dietas con menor contenido de proteína conforme aumenta el peso corporal.

(2) Estresores – tal como el estrés alimenticio causado por el cambio de porcentaje de inclusión proteínico a otro menor, o el que resulta de la manipulación física, encontrándose una disminución de la actividad de la tripsina y quimiotripsina en las heces y el hepatopáncreas (Córdova *et al.*, 2004).

(3) Calidad de agua – las tasas de digestibilidad de la materia seca pueden ser reducidas a temperatura de 28 °C y salinidad de 35 ppm (Cabanillas *et al.*, 2001).

(4) Especie – se han descrito diferencias en patrones de la acción de la proteasa entre adultos de *Farfantepenaeus californiensis*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Litopenaeus schmitti* y *Litopenaeus vannamei*, lo que sugiere que la digestión de proteína podría ser específica de especie (Lemos *et al.*, 2000).

En el presente estudio, se utilizaron camarones *L. vannamei* con un peso inicial de 4.9 g (\pm 0.34 g) alimentados con dietas isoproteínicas y formuladas de acuerdo con los requerimientos nutricionales para juveniles, siendo el manejo de colecta diaria de heces igualmente realizado para todos los grupos experimentales. Así mismo, las condiciones de la calidad de agua se mantuvieron en los rangos considerados ideales para el cultivo de la especie, teniendo las premisas de mínimo estrés y mayor crecimiento (Wyban *et al.*, 1995; Van Wyk y Scarpa, 1999). Por lo tanto, se puede sugerir que las diferencias de digestibilidad encontrados entre los grupos experimentales en el presente trabajo fueron mínimamente afectados por factores extrínsecos o intrínsecos.

Aunque hubo diferencias estadísticas en los resultados de digestibilidad, el desempeño de crecimiento no fue afectado negativamente por el remplazo de la harina de pescado por la biomasa residual, siendo posible la sustitución total sin afectación al crecimiento. Es interesante observar que la mayor digestibilidad encontrada en la dieta experimental BRM no se reflejó en el crecimiento. Sin embargo, es importante mencionar que este bioensayo se realizó durante un

periodo de 6 semanas, tiempo suficiente para coleccionar la cantidad de heces requerida para los análisis de digestibilidad. Por lo que, el efecto a largo plazo de la digestibilidad en el desempeño productivo no pudo evaluarse, cabe también señalar que, estas evaluaciones en una engorda semi-intensiva comercial duran aproximadamente 16 semanas (INAPESCA, 2018).

La falta de un efecto de la sustitución de la harina de pescado por la biomasa residual en el desempeño de crecimiento observada en este trabajo constituye una diferencia interesante en comparación con el estudio realizado con la BR por Qiu y Davis (2017); en uno de sus bioensayos realizados con juveniles de *L. vannamei* (peso inicial de 0.59 g) que fueron alimentados por 6 semanas con cuatro dietas donde la harina de pescado fue sustituida gradualmente por la BR; como principales resultados, reportaron que el crecimiento y la tasa de conversión alimenticia fueron comprometidos en la mayor inclusión de la BR (100 g/kg), siendo atribuidos a una posible baja palatabilidad o desequilibrios nutricionales en la dieta con menor inclusión de harina de pescado. Pero, a diferencia del presente estudio, Qiu y Davis (2017) usaron únicamente fuentes adicionales de proteína de origen vegetal. Por ello, se puede suponer que la combinación de fuentes proteínicas vegetales y animales usadas en el presente estudio, resultó en una mejor palatabilidad y/o un mejor equilibrio nutricional de las dietas, tal como el perfil de aminoácidos, permitiendo el reemplazo total de la harina de pescado sin reducir al desempeño de crecimiento, lo que requiere mayor investigación.

Por otra parte, en el estudio de Qiu y Davis (2017) no se probaron dietas 100% libres de pescado, como en este trabajo; por lo tanto, este es uno de los primeros reportes donde se sustituyó totalmente la harina de pescado por la biomasa residual de la síntesis de treonina (BR) sin perjuicio al crecimiento. Lo anterior sólo se ha observado en el caso del Pámpano de Florida (*T. carolinus*) donde se sustituyó totalmente la harina de pescado por la BR sin comprometer el desempeño del crecimiento (Rhodes *et al.*, 2015).

Con el fin de evaluar el estado nutricional de los camarones, al final del bioensayo se midió el índice hepatosomático, ya que el hepatopáncreas tiene la función de asimilar el alimento. Este órgano representa del 2 al 6% del peso total del camarón, es el sitio donde ocurren una serie de procesos integrados que incluyen la secreción de enzimas digestivas, digestión y absorción de nutrimentos, almacenamiento de carbohidratos, lípidos y minerales, y la distribución de las reservas durante su fase de intermuda (Dall *et al.*, 1990; Guevara, 2003). El hecho de que no hubo diferencias estadísticas en los valores del índice hepatosomático entre las dietas experimentales podría sugerir que no hubo un cambio en el depósito de nutrientes y, por lo tanto, en el estado nutricional de los juveniles al aumentar la inclusión de la BR; sin embargo, se requiere mayor investigación a este respecto.

En tanto, la composición proximal del músculo proporciona una información relevante a su composición nutrimental. La aceptación de los productos acuícolas depende de que sean inocuos, tengan buena calidad nutricional, además de características organolépticas (sabor, olor, color y firmeza) deseables por el consumidor. La dieta es uno de los factores que pueden afectar la calidad de los productos acuícolas (Ezquerro *et al.*, 2004). Se sabe que en el cultivo, crecimiento y desarrollo de los camarones peneidos, estos pueden ser afectados por el contenido y calidad de la proteína dietaria, entre otros factores (New, 1980). Se menciona que hay una relación entre la textura y el contenido de grasa en el músculo de camarón, así que aquellos camarones cuyo contenido de grasa en el músculo es más elevado, presentan textura menos firme y son menos aceptados (Rivas *et al.*, 2001; Ezquerro *et al.*, 2004) por el consumidor.

En el presente estudio, los resultados de los análisis de la composición muscular de los camarones de los cuatro tratamientos experimentales no presentaron diferencias significativas en los resultados de humedad, proteína, lípidos o cenizas. Sin embargo, en el estudio realizado por Qiu y Davis (2017), se encontraron diferencias significativas en el análisis de lípidos de camarón entero, donde el grupo experimental alimentado con una dieta con una inclusión 120 g/kg tuvo un nivel de

lípidos significativamente más bajo que los otros grupos experimentales. Ellos explicaron que la diferencia se debió a la forma de secado de la BR utilizada. Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el uso de la BR no afectó la calidad del músculo.

7. CONCLUSIONES

Se evaluaron los efectos de la sustitución gradual de la harina de pescado con una inclusión creciente de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en la digestibilidad aparente *in vivo* (materia seca y proteína) y se encontró que las mayores tasas de digestibilidad de la dieta se obtienen cuando se usa en una proporción de 40 y 71.8 g/kg de dieta, de harina de pescado y biomasa residual, respectivamente.

De igual manera se evaluaron parámetros de desempeño de crecimiento (tasa de crecimiento específico, crecimiento semanal, tasa de conversión alimenticia) de juveniles de camarón alimentados con dietas formuladas con diferentes porcentajes de inclusión de la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en combinación con fuentes proteicas de origen animal y vegetal para sustituir la harina de pescado, y los resultados de este estudio demuestran que se puede sustituir la harina de pescado parcial o totalmente por la biomasa residual de la biosíntesis de treonina en conjunto con otras fuentes de proteína de origen animal (harina de ave) y vegetal (gluten de maíz y soya) en dietas formuladas para juveniles de *L. vannamei* con un peso promedio inicial de 4.9 g (\pm 0.34 g) sin comprometer el crecimiento o la calidad nutricional del músculo.

De acuerdo con lo anterior se deben realizar más investigaciones respecto a la interacción y el efecto asociativo positivo de ingredientes proteicos de origen animal y vegetal.; además de ser necesario realizar más estudios a largo plazo, sobre los efectos de la alimentación con biomasa residual de la fermentación en los parámetros de crecimiento y composición química de los camarones haciendo énfasis en la composición mineral y perfil de aminoácidos.

8. REFERENCIAS

- Almeida, F.N., Sulabo, R.C., Stein, H.H. (2014). "Amino acid digestibility and concentration of digestible and metabolizable energy in a threonine biomass product fed to weanling pigs". *J. Anim. Sci.* 92, 4540–4546. DOI:10.2527/jas2013-6635
- AKIYAMA, D.M. (1989) "Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone". *Nippon Suisan Gakkaishi*.55(1) p 91-98.
- AOAC (2015) *Official Methods of Analysis*. VA, USA: Association of Analytical Chemists, Arlington
- APHA (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed. Washington, DC, EUA: APHA
- Burr, G., Peterson, B., Pietrak, M., Sealey, W., Block, S., Bowzer, J. (2020) "Effect of PROPLEX DY and PROPLEX T on growth performance of Atlantic salmon smolts". *Aquaculture Research* 00:1 – 9.
- Cabanillas , B.H., Ponce Palafox , P. J. T., Martínez , P. C. A., Chávez , S. M., & 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 desde cultivo". *Ciencias marinas*, 577-593.
- Civera, C. R., Villarreal, H., Goytortúa, E., Rocha, S., Vega, F., Nolasco, H., Pastén, J., Camarillo, T. "Uso de la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína en dietas experimentales para camarón". En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. (Eds.) 1999. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Monterrey, N.L., México. ISBN 968-7808-62-4. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. 325 - 347.
- CONAPESCA (2018) *Anuario estadístico de acuicultura y pesca*. México: Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.

- Córdova, M. J. García, G. Fernando L., Navarrete-del-Toro M.A. (2004) "Effect of stressors on shrimp digestive enzymes from assays of feces: an alternate method of evaluation." *Aquaculture*, 233(1-4), 439–449. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.012
- Cortés J. H., R. Villarreal, C. R., Civera-Cerecedo y Martínez R. C. (2003) "Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae)". *Aquacult. Nut.*, 9: 207-210.
- Cruz, S.L.E., Tapia S. M., Villarreal, C. D., Beltrán, R., J., Nieto, L., G.M., Lemme, A, Ricque-Marie, D. (2009) "Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles." *Aquaculture* 292: 87–94
- Cruz, S. L.E., Villarreal, C. H., Tapia, S. M., Nieto, L. M.G., Villarreal, C. D.A. y Ricque-Marie D. (Eds.) (2008). *Manual de Metodologías de Digestibilidad in vivo e in vitro para Ingredientes y Dietas para Camarón*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty., N.L., México. ISBN: 978-607-433-020-5.
- Cuéllar, L., M.B., Asiain, H. A., Juárez, S. J.P., Reta, M. J.L., y Gallardo, L. F. (2018) Evolución normativa e institucional de la acuicultura en México, *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 4(12). 541-564. ISSN 1870-5472.
- Davis, D. A., & Arnold, C. R. (1995) "Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*." *Aquaculture*, 133(3-4), 287–294. doi:10.1016/0044-8486(95)00016-u
- Dall, W, Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. y Sharples, D.J. (1990) "The biology of Penaeidae". *Advances on Marine Biology* 27: 1-489.
- Edwards, P., Zhang, W., Belton, B., Little, D.C. (2019) "Misunderstandings, myths and mantras in aquaculture: Its contribution to world food supplies has been systematically over reported". *Marine Policy* 106: 103547
- Ezquerro, B. J.M., Bringas, A. L., Burgos, H. A., Rouzaud, S. O. (2004) "Control de la composición química y atributos de calidad de camarones cultivados". En Cruz

suaréz, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.g., Villarreal, D., Scholz, U., Gonzalez, M. (2004) Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

FAO. (2018) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma: FAO.

FAO. (2021) FAOSTAT: Datos. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/FBS> (Visitado: 08 febrero 2021)

FAO. (2020) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma: FAO.

Fenucci, J. L. (2008) “Método Utilizado por la Universidad Nacional de Mar del Plata para la Medición de Digestibilidad in vivo en Camarón”. En: Cruz-Suárez L.E., Villarreal-Colmenares H., Tapia-Salazar M., Nieto-López M.G., Villarreal-Cavazos D.A. y Ricque-Marie D. (Eds.) *Manual de Metodologías de Digestibilidad in vivo e in vitro para Ingredientes y Dietas para Camarón*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty., N.L., México. 18-34 ISBN: 978-607-433-020-5.

Fox M.J., Lawrence L.A. (2008) “Revisión de la metodología utilizada para determinar la digestibilidad aparente de nutrientes en camarones peneidos marinos”. En: Cruz-Suárez L.E., Villarreal-Colmenares H., Tapia-Salazar M., Nieto-López M.G., Villarreal-Cavazos D.A. y Ricque-Marie D. (Eds.) *Manual de Metodologías de Digestibilidad in vivo e in vitro para Ingredientes y Dietas para Camarón*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty., N.L., México. 18-34 ISBN: 978-607-433-020-5. 1 - 17

Furtado, P. S., Poersch L. H., Wilson W. Jr. (2015) “The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT).” *Aquaculture International* 23:345–358

Gamboa, D. J., Molina, P. C., & Cahu, C. (2003) “Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of

body weight". *Aquaculture Research*, 34(15), 1403–1411. doi:10.1111/j.1365-2109.2003.00959.x

García, G. T., Villarreal, C. H. y Fenucci, J. L. (Eds.) (2007) *Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos*. Argentina: Eudem.

Glencross, B. D., Booth, M., & Allan, G. L. (2007) "A feed is only as good as its ingredients? a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds." *Aquaculture Nutrition*, 13(1), 17–34. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x

González, T.L., Téllez, V. A., Sampedro G.J. y Nájera, H. (2007) Las proteínas en la nutrición. *RESPYN*, 8(2).

González, S. R., Romero, C.O., Valdivié, N. M., Ponce-Palafox, J. T. (2014) "Los productos y subproductos vegetales, animales y agroindustriales: Una alternativa para la alimentación de la tilapia". *Revista Bio Ciencias* 2(4): 240-251

Guevara, W. (2003). *Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos*. Perú: Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann

Gutiérrez F, Zaldívar J, Contreras C. (2009) "Coeficientes de digestibilidad aparente de harina de pescado peruana y maíz amarillo duro para *Colossoma macropomum* (*Actinopterygii*, *Characidae*)". *Rev. Peru. Biol*, 15(2): 111- 115

HLPE (2014). *La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición: Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición*. Roma: Comité de Seguridad Alimentaria Mundial.

INAPESCA (2018). Acuicultura | Camarón blanco del Pacífico. Acuicultura comercial. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico> (Visitado: 11 febrero 2021)

Index Mundi (2021) Index Mundi Commodity Prices. Disponible en: <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity> (Visitado: 06 febrero 2021)

- Jory, D. E., Cabrera, T. R., Dugger, D. M, Fegan D., Lee P. G., Lawrence A. L., Jackson C. J., McIntosh R. P., y Castañeda J. (2001). "A global review of shrimp feed management: status and perspectives". *The World Aquaculture Society* 104–152
- Lee S.M., Cho S.H., and Kim. K.D. (2000). "Effects of dietary protein and energy levels on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*". *Journal of World Aquaculture Society* 31:306–315
- Lemos, D., Ezquerro J.M., Garcia C. F. L. (2000). "Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility". *Aquaculture* 186:89–105
- Lin, H., Liu, Y., Tian, L., Wang, J., Zheng, W., Huang, J., Chen, P. (2004). "Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for grouper *Epinephelus coioides*". *Journal of World Aquaculture Society* 35 (2): 134–142.
- Mata, S. J.A., Tinajero, C. A., Barreto, C. F., Pares, S.G., Rio, Z. O.B., Viana, M.T., Rombenso, A.N. (2018) "DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in Totoaba macdonaldi fish oil-free feeds containing poultry by-product meal and beef tallow." *Aquaculture* 497, 440–451. ISSN 0044-8486
- Martínez, P. C.A., Chávez, S. M.C., Olvera, N.M.A., Abdo de la parra M.I. "Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura." En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. (eds). 1999. Avances en Nutrición Acuícola III. *Memorias del Tercer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos*. Monterrey, N.L., México. ISBN 968-7808-62-4. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. 279 - 323.
- Martínez, C.L.R., Martínez, P.M., & Cortés, J.E. (2009). "Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?" *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(3): 181-196.
- Martínez A.O., Martínez de Victoria E. (2006) "Proteínas y péptidos en nutrición enteral". *Nutr. Hosp.*, 21(Suppl 2), 01-14. ISSN 1699-5198

Molina, P. C. y Villarreal, C.H. (eds.) (2008). *Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón*. La Paz, B.C.S.: CIBNOR, S.A., CYTED y PRONACA.

New, M. B. (1980). "A bibliography of shrimp and prawn nutrition". *Aquaculture*, 21(2), 101–128. doi:10.1016/0044-8486(80)90020-4

Qiu X., Davis D.A. (2016) "Evaluation of flash dried yeast as a nutritional supplement in plant-based practical diets for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*", *Aquaculture Nutrition*.00, 1 – 10. DOI: 10.1111/anu.12499

Qiu X., Davis D.A. (2017). "Evaluation of dried fermented biomass as a feed ingredient in plant-based practical diets for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*", *Aquaculture Nutrition*.00, 1 – 9. DOI: 10.1111/anu.12569

Rapallo, R. y Rivera, R. (2019) *Nuevos patrones alimentarios, más desafíos para los sistemas alimentarios. 2030 - Alimentación, agricultura y desarrollo rural en América Latina y el Caribe*, No. 11. Santiago de Chile. FAO. 25 p.

Ricque M. D., Nieto, L. M., Tapia, S. M., Guajardo B.C., Villarreal, C. D., Peña, R.A., Cruz, S. E. L. "Métodos utilizados por la Universidad Autónoma de Nuevo León para determinar la digestibilidad *in vivo* en camarón." En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. (eds.) (2008). *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos*. Monterrey, N.L., México. ISBN 968-7808-62-4. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. 48 - 83.

Rivas, V. M. E., Rouzaud, S.O., Martinez, C. L. R., & Ezquerrabrauer, J. M. (2001). "Effects of Feed Protein Levels on Digestive Proteolytic Activity, Texture, and Thermal Denaturation of Muscle Protein in Reared Blue Shrimp". *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(4), 25–38. doi:10.1300/j030v10n04_03

Rosales, M., Castillo, S., Pohlenz, C., Gatlin, D.M. (2017) "Evaluation of dried yeast and threonine fermentation biomass as partial fish meal replacements in the diet of red drum *Sciaenops ocellatus*". *Animal Feed Science and Technology*, 232, 190-197, ISSN 0377-8401

- Rhodes M. A., Zhou Y. y Davis, D. A. (2015) "Use of Dried Fermented Biomass as a Fish Meal Replacement in Practical Diets of Florida Pompano, *Trachinotus carolinus*", *Journal of Applied Aquaculture*, 27(1), 29-39. DOI: 10.1080/10454438.2014.959834
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2020) Impulsa Agricultura estrategia sanitaria para fortalecer sector acuícola del país. Comunicado de prensa. 15 de marzo de 2020. México.
- Sanz, A., García G. M., De la Higuera M. (2000) "Protein nutrition in fish: protein/energy ratio and alternative protein sources to fish meal". *J. Physiol. Biochem.*, 56 (3), 275-282
- Teshima Sh., S. Koshio, M. Ishikawa, Md. Shah y L. Hernandez. (2006) "Protein requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* evaluated by the factorial method". *J. World Aquacult. Soc.*, 37: 145–153.
- Turchini, G. M., Trushenski, J. T., & Glencross, B. D. (2019). "Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds". *North American Journal of Aquaculture*. doi:10.1002/naaq.10067
- Van Wyk P. y Scarpa, J. (1999) "Water Quality Requirements and Management". Chapter 8 in *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. USA: Florida Department of Agriculture and Consumers Services. Harbor Branch Oceanographic Institution
- Vásquez T.W. (2007) "Las dietas como factor de impacto sobre la calidad del agua en sistemas de cultivo intensivo de peces." *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola*, 2: 179-190
- Velasco, M., Lawrence, A.L., Neil, W.H. (1999) "Efectos de la proteína y el fosforo dietario en la calidad de agua de acuicultura". En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. Editores. 1999. *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de*

Alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. Pp. 597 - 612

Wyban, J., Walsh, W., y Godin, D. (1995) "Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*)."
Aquaculture, 138(1-4), pp. 267-297. DOI: 10.1016/0044-8486(95)00032-1