



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE LA FITASA EXÓGENA EN LA FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y LA UTILIZACIÓN DEL FÓSFORO DIETÉTICO EN LOS JUVENILES DEL CAMARÓN BLANCO *PENAEUS VANNAMEI* ALIMENTADOS CON FUENTES DE PROTEÍNA VEGETAL.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JORGE LUIS GAMBOA ÁLVAREZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTES (UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN DE SISAL, FAC. DE CIENCIAS, UNAM).

COMITÉ TUTOR:

DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ (LABORATORIO DE PRODUCCIÓN ACUÍCOLA, UNAM-FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA).

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ (LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA DE RECURSOS ACUÁTICOS, UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO).

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ (CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO - COORDINACIÓN REGIONAL MAZATLÁN).

DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ (LABORATORIO DE ESTUDIOS ECOGÉNICOS, FACULTAD DE CIENCIAS UNAM).

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE 2023



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.



TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
EFECTO DE LA FITASA EXÓGENA EN LA FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y LA
UTILIZACIÓN DEL FÓSFORO DIETÉTICO EN LOS JUVENILES DEL CAMARÓN
BLANCO *PENAEUS VANNAMEI* ALIMENTADOS CON FUENTES DE PROTEÍNA
VEGETAL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. JORGE LUIS GAMBOA ÁLVARE

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTES (UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE
DOCENCIA E INVESTIGACIÓN DE SISAL, FAC. DE CIENCIAS, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ (LABORATORIO DE PRODUCCIÓN
ACUÍCOLA, UNAM-FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA).

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ (LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA DE
RECURSOS ACUÁTICOS, UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO).

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ (CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO - COORDINACIÓN REGIONAL MAZATLÁN).

DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ (LABORATORIO DE ESTUDIOS
ECOGÉNOMICOS, FACULTAD DE CIENCIAS UNAM).

MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2023.

DEDICATORIA

Dedico este documento, el cual es un resumen del conocimiento, esfuerzo, aprendizaje y experiencias compartidas con mis tutores académicos, a mi pequeña ***Daniela Gamboa Hernández***.

Gracias por alentarme con tu sonrisa y emocionarte a mi lado con lo maravilloso de la vida y la biología.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Gabriela Gaxiola Cortés por su dirección, mentoría, amistad y confianza durante mi desarrollo académico, por su energía y acompañamiento constante para alcanzar este logro, sin duda no hubiese sido posible sin su apoyo. Muchas gracias.

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, por todas las facilidades otorgadas en el laboratorio a su cargo, laboratorio de fisiología de recursos acuáticos de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Gracias por compartir su conocimiento y apoyo en técnicas y procesos analíticos, así como en su disposición y cercanía para culminar este proyecto de tesis.

A mis asesores, la Dra. Crisantema Hernández González del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD – Mazatlán), la Dra. María Leticia Arena Ortíz, de la Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la UNAM en Yucatán y al Dr. Luis Héctor Hernández Hernández, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM), por haber sido las guías académicas necesarias para la realización de este documento, por sus aportes y facilidades para alcanzar este logro. Muchas gracias.

Al Dr. Carlos Maldonado Flores, por su amistad y compañerismo desde hace varios años, y por haber compartido sus experiencias para nutrir la tesis. Así mismo, por todas las facilidades brindadas para poder finalizar este proceso de titulación.

A Itzel Alejandra Sánchez Tapia, gracias infinitas por alentarme y acompañarme siempre en mi crecimiento profesional, gracias por estar, por apoyarme y motivarme.

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM – Sisal, por el un espacio de oportunidad académica en su programa de doctorado en Ciencias del Mar y Limnología, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado otorgada (277635).

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la inclusión de la fitasa en dietas ricas en proteína vegetal (pasta de soya y pasta de canola) sobre la zootecnia, actividad de las enzimas endoproteinasas (tripsina y quimotripsina), la digestibilidad aparente del fósforo y la proteína de la dieta, el balance bioenergético, así como en los indicadores inmunológicos: conteo total de hemocitos (CTH) y presión osmótica (mOsm); y en la calidad del músculo (textura) de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei*. Para ello, la enzima se incluyó en la dieta en dos maneras diferentes: 2500 FTU de Ronozyme/Kg de alimento, y 1600 FTU experimental (FTEII) previo a la elaboración del alimento, hidrolizando el ácido fítico de la pasta de soya y de canola en las dietas. Se realizaron 3 experimentos: En el primer experimento se evaluó el efecto de la fitasa en dietas vegetales enriquecidas con fósforo inorgánico proveniente de la premezcla de minerales (premix), considerando como variables de respuesta el crecimiento, la supervivencia, la actividad enzimática y la bioenergética de 270 juveniles ($7.2 \pm 0.6\text{g}$) en un diseño experimental completamente aleatorizado, con tres tratamientos (dieta vegetal control “T₁”, dieta vegetal fitasa Ronozyme “T₂” y dieta vegetal fitasa experimental “T₃”, con 6 repeticiones cada una. En el segundo experimento se evaluó si la hidrólisis del fósforo fítico podía sustituir la incorporación del fósforo inorgánico, considerando para ello, la digestibilidad aparente de fósforo (DAF), la digestibilidad aparente de la materia seca (DAM) y la digestibilidad aparente de la proteína (DAP) en 585 juveniles de *P. vannamei* con peso promedio de $1.7 \pm 0.2\text{g}$ distribuidos en 9 tanques (3 réplicas por tratamiento). Por último, en el tercer experimento se compararon 5 niveles de sustitución de harina de pescado por fuentes vegetales (soya y canola) y la incorporación de fitasa, CaHPO₄ y betaína, las cuales fueron comparadas con una dieta comercial en juveniles de camarón blanco con peso promedio de $2.56 \pm 0.31\text{g}$ distribuidos a una densidad de 20 camarones por tanque (6 réplicas por tratamiento), donde las variables de respuesta fueron aspectos zootécnicos, la digestibilidad aparente, la actividad enzimática, las variables inmunológicas CTH y mOsm, la calidad del músculo y la bioenergética. Los resultados obtenidos sugieren

que la fitasa en dietas a base de soya y canola favorece el crecimiento en los camarones juveniles de *P. vannamei*, al presentar diferencias significativas entre los pesos finales de los tratamientos ($P < 0,05$), obteniendo los mejores valores en los organismos de los tratamientos T₃ (9.8 ± 1.0 g) y T₂ (9.6 ± 1.2 g), que superaron al tratamiento sin fitasa (8.9 ± 1.0 g). La actividad enzimática de quimotripsina y la concentración de la proteína soluble del hepatopáncreas de juveniles camarón *P. vannamei* no fue afectada por la inclusión de fitasa (ya sea la Ronozyme o el pretratamiento de las fuentes vegetales con la FTEII). Sin embargo, los resultados de la digestibilidad aparente de la proteína y del fósforo no mejoraron significativamente en las dietas que presentaron la fitasa ($p > 0.05$) y que carecían de fósforo del Premix. No obstante, cuando las dietas eran enriquecidas con fósforo inorgánico (Premix y CaHPO₄), tratadas con fitasa Ronozyme P5000 CT e incorporación de betaína como attractante, estas no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las variables de crecimiento, indicadores inmunológicos (CTH y mOsm), incremento de calor aparente (HiE) del balance bioenergético y la calidad del músculo de los organismos alimentados con diferentes niveles de harina de pescado (T₁-T₅) y el alimento comercial (T₆). En cuanto a la actividad de la superóxido dismutasa SOD se presentaron diferencias entre los tratamientos, donde el valor más bajo se obtuvo en el T₂. Dado que los mayores valores de biomasa ($P < 0,05$) se presentaron en el T₄ y el T₆, con 119.7 ± 8.4 y 126.6 ± 17.5 g respectivamente, y sumado al mejoramiento en los índices de supervivencia (92.5%) se concluyó que la dieta formulada con pasta de soya y de canola del T₄ es la más adecuada para los juveniles de *P. vannamei*.

Palabras claves: *Litopenaeus vannamei*, fitasa exógena, fuentes vegetales.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	3
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
I.- INTRODUCCIÓN.....	14
II.- ANTECEDENTES.....	15
III.- JUSTIFICACIÓN.....	31
IV.- PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	32
V.- HIPÓTESIS GENERAL.....	33
VI.- OBJETIVOS.	34
6.1.- Objetivo general.	34
6.2.- Objetivos particulares.....	34
VII.- ESQUEMA GENERAL DE LOS BIOENSAYOS.....	35
CAPÍTULO 1	36
RESUMEN	38
8.1.1- INTRODUCCIÓN.....	39
8.1.2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	41
8.1.3.- HIPÓTESIS.	42
8.1.4.- OBJETIVO.	43
8.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
8.2.1.- Dispositivo Experimental.	44
8.2.2- Composición de las dietas.	44
8.2.3.- Condiciones de manejo de los organismos.....	46
8.2.4.- Alimentación.	47
8.2.5.- Parámetros evaluados.	47
8.2.5.1- Supervivencia, crecimiento y SGR.....	47

8.2.5.2.- Indicadores de la respuesta fisiológica.....	48
8.2.5.2.1.- Consumo de oxígeno.	48
8.2.5.2.2.- Balance bioenergético.	51
8.2.5.3.- Actividad enzimática y concentración de proteína soluble.....	52
8.2.6.- Análisis estadísticos.....	53
8.3.- RESULTADOS.	55
8.3.1.- Supervivencia, Crecimiento y SGR.	55
8.3.2.- Proteína soluble, actividad específica de la tripsina y la quimotripsina.	57
8.3.3.- Balance bioenergético.....	59
8.4.- DISCUSIÓN.....	61
8.5.- CONCLUSIONES.....	65
CAPÍTULO 2.....	66
RESUMEN.....	68
9.1.1.- INTRODUCCIÓN.....	69
9.1.2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	71
9.1.3.- HIPÓTESIS.	72
9.1.4.- OBJETIVO.	73
9.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
9.2.1.- Diseño experimental.	74
9.2.2.- Composición de las dietas.	74
9.2.3.- Condiciones de manejo de los organismos.....	76
9.2.4.- Alimentación.	76
9.2.5.-Técnica de colección de heces.....	77
9.2.6.- Parámetros a evaluar.....	77
9.2.6.1- Supervivencia y crecimiento.	77
9.2.6.2.- Determinación de la Digestibilidad Aparente.....	78
9.2.6.3.- Determinación de la niveles de fósforo en la hemolinfa.	78
9.2.6.4.- Determinación de textura.....	79
9.2.7.- Análisis estadísticos.....	79

9.3.- RESULTADOS	80
9.3.1.- Supervivencia y Crecimiento.....	80
9.3.2.- Coeficientes de digestibilidad aparente.	81
9.3.3.- Textura y concentración de fósforo en hemolinfa.	83
9.4.- DISCUSIÓN.....	84
9.5.- CONCLUSIONES.....	88
CAPÍTULO 3.....	89
RESUMEN	91
10.1.1.- INTRODUCCIÓN.....	93
10.1.2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	95
10.1.3.- HIPÓTESIS.	96
10.1.4.- OBJETIVO.	97
10.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
10.2.1. Dispositivo experimental	98
10.2.2.- Composición de las dietas	98
10.2.3.- Condiciones de manejo de los organismos.....	100
10.2.4.- Alimentación	100
10.2.5.- Parámetros evaluados	100
10.2.5.1- Supervivencia, crecimiento y SGR.....	100
10.2.5.2- Tasa de conversión alimenticia y tasa de eficiencia proteica	101
10.2.5.3.-Determinación de textura (resistencia al corte)	101
10.2.5.4.- Indicadores de la respuesta fisiológica	102
10.2.5.4.1.- Consumo de oxígeno	102
10.2.5.5.- Actividad enzimática y concentración de proteína soluble.....	106
10.2.5.6.- Parámetros biológicos de la hemolinfa.....	107
10.2.5.6.1.- Conteo total de hemocitos (CTH).....	108
10.2.5.6.2.- Presión Osmótica (mOsm).	108
10.2.5.7.- Determinación de superóxido dismutasa (SOD)	108
10.2.5.8.- Calidad del alimento.....	109

10.2.5.8.1.- Análisis químico proximal	109
10.2.5.8.2.- Determinación de estabilidad en el agua (Hidroestabilidad).....	109
10.2.5.8.3.- Análisis de dureza del alimento.....	110
10.2.6.- Análisis estadísticos.....	110
10.3.- RESULTADOS.	111
10.3.1.- Supervivencia, Crecimiento y SGR.....	111
10.3.2.- Biomasa, TCA y TEP.....	112
10.3.3.- Textura.....	113
10.3.4.- Balance bioenergético	113
10.3.5.- Proteína soluble, actividad específica de la tripsina y la quimotripsina.	116
10.3.6.-. Conteo total de hemocitos (CTH) Y Presión Osmótica (mOsm).	117
10.3.7.-. Superóxido dismutasa (SOD) en músculo de camarón	117
10.3.8.- Calidad del alimento.....	118
10.3.8.1 Análisis químico proximal.....	118
10.3.8.2.- Determinación de estabilidad en el agua (Hidroestabilidad).....	119
10.3.8.3.- Análisis de dureza del alimento.....	119
10.4.-DISCUSIÓN.....	120
10.5.- CONCLUSIONES.....	126
XI.- DISCUSIÓN GENERAL	¡Error! Marcador no definido.
XII. CONCLUSIONES GENERALES	127
XIII.- LITERATURA CITADA	128
XIV. ANEXOS	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de camarones.....	19
Figura 2. Supervivencia promedio.....	55
Figura 3. Promedios de crecimiento.	56
Figura 4. Tasa específica de crecimiento.....	57
Figura 5. Índice del reparto bioenergético en juveniles de <i>L. vannamei</i>	60
Figura 6. Supervivencia promedio.....	80
Figura 7. Promedios de crecimiento.	81
Figura 8. Promedios de fósforo en heces y alimento.....	82
Figura 9. Supervivencia promedio de los tratamientos (T1 – T6).....	111
Figura 10. Biomasa promedio de los tratamientos (T1 – T6).....	112
Figura 11. Índice del reparto bioenergético en juveniles de <i>L. vannamei</i>	115
Figura 12. Actividad SOD (T1 – T6).	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estudios de sustitución de la harina de pescado	24
Tabla 2 Estudios de inclusión de soya	25
Tabla 3 Estudios de inclusión de canola	26
Tabla 4 Formulación de dietas para el experimento 1.	46
Tabla 5 Datos de supervivencia del experimento 1.	56
Tabla 6 Datos de crecimiento de juveniles <i>L.vannamei</i> .	57
Tabla 7 Datos de SGR..	58
Tabla 8 Concentración de proteína soluble	59
Tabla 9 Datos de actividad de tripsina.	59
Tabla 10 Datos de actividad de quimotripsina	59
Tabla 11 Promedios de HeE, HiE y RE.	60
Tabla 12 Resultados del balance bioenergético	60
Tabla 13 Formulación de dietas para el bioensayo 2.	77
Tabla 14 Datos de supervivencia.	82
Tabla 15. Datos de crecimiento..	83
Tabla 16 Coeficientes de digestibilidad aparente “CDA”..	84
Tabla 17 Análisis de textura.	85
Tabla 18 Análisis de fósforo en hemolinfa.	85
Tabla 19 Formulación de dietas para el bioensayo 3.	100
Tabla 20 Datos de supervivencia, ganancia de peso y SGR .	113
Tabla 21 Datos de biomasa, TCA y TEP	114
Tabla 22 Datos de textura (resistencia al corte) .	114
Tabla 23 Balance bioenergético	115
Tabla 24 Promedios de concentración de la proteína soluble \pm error estándar.	117
Tabla 25 Promedios de actividad de tripsina y quimotripsina.	117
Tabla 26 Promedios del CTH y mOsm	118
Tabla 27 Promedios de actividad SOD	118
Tabla 28 Composición proximal de las dietas.	119
Tabla 29 Datos de MSR	120
Tabla 30 Analisis de dureza del alimento	120

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
AIA	Acid Insoluble Ash (cenizas insolubles en ácido)
CDA Proteína	Coefficiente de digestibilidad aparente de proteína
CDA Fósforo	Coefficiente de digestibilidad aparente de fósforo
CDAMS	Coefficiente de digestibilidad aparente de materia seca
°C	Grados centígrados
C.P.	Concentrado proteico
U/g GD	Unidades por gramo de glándula digestiva
g	Gramos
L	Litros
h	Horas
Cr₂O₃	Óxido de cromo
Ca	Calcio
P	Fósforo
Mg	Magnesio
AF	Ácido fítico
PI	Postlarvas
Asp	Ácido aspártico
Ser	Serina
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
Arg	Arginina
Thr	Treonina
Ala	Alanina
Pro	Prolina
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Met	Metinina
Lys	Lisina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Phe	Fenilalanina
Trip	Triptófano
CQ	Cómputo químico
AQP	Análisis Químico Proximal
M	Materia seca
H	Humedad
C	Cenizas

PC	Proteína cruda
EE	Extracto etéreo
FC	Fibra cruda
ELN	Extracto libre de nitrógeno
CTH	Conteo total de hemocitos
mOsm	Presión osmótica
SOD	Superóxido dismutasa
SGR	Specific growth rate (Tasa específica del crecimiento).
O₂	Oxígeno

**.EFECTO DE LA FITASA EXÓGENA EN LA FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y LA
UTILIZACIÓN DEL FÓSFORO DIETÉTICO EN LOS JUVENILES DEL
CAMARÓN BLANCO *Penaeus vannamei* ALIMENTADOS CON FUENTES DE
PROTEÍNA VEGETAL.**

I.- INTRODUCCIÓN.

La industria acuícola ha tenido un incremento considerable en los últimos 50 años, sin embargo, esta actividad sigue siendo dependiente de la pesca de captura marina para el aprovisionamiento de insumos claves en la dieta de los organismos cultivados (Tacón, 2008; Luthada-Raswiswi et al., 2021). Sin embargo, de acuerdo a la información publicada en el Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura en el año 2022, el porcentaje de la población de peces que se encuentran en niveles biológicamente sostenibles, descendió del 90% en 1974 al 64% en 2019 (FAO, 2022). En consecuencia, el precio de los insumos más importantes en la elaboración de los alimentos de especies acuícolas (el aceite y la harina de pescado) ha ido en aumento, razón por la cual, es prioritaria la búsqueda de insumos alternos para la obtención de proteína, como lo son de forma reciente, los insumos vegetales (Tacón y Foster, 2000; Hardy, 2008; Katheline et al., 2019). La proteína proveniente de insumos como la canola, el trigo, el lupino y la harina de soya (*Glycine maxima*), entre otras; han sido estudiadas como insumos potenciales para la elaboración de dietas de especies acuícolas (Hardy, 1999; Kissinger et al., 2016), sin embargo, se ha observado que cuando el alimento es elaborado con proteína de origen vegetal, disminuye la ingestión en los juveniles de camarón, debido a la falta de atrayentes y por la presencia de fitatos, que disminuyen la biodisponibilidad de ciertos minerales de importancia nutricional (Lee y Meyer, 1996; Mendoza *et al.*, 2000; Mendoza, 2003). Actualmente se han comenzado a probar fitasas de origen exógeno como una estrategia para la utilización de fósforo fítico, mediante la hidrólisis del ácido fítico (AF) durante la digestión o durante el procesamiento del alimento. Ello ha mejorado la absorción y retención del P, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y aminoácidos (Rebollar y Mateos, 1999; Gómez-Villalva, 2005, Gamboa, 2011).

Hay que considerar que el alimento puede representar del 50 al 60% del costo total de producción, por lo que cualquier mejoría en su uso, formulación o proceso, puede generar una importante disminución en el costo total de la actividad del cultivo de camarón (Devresse, 2000).

II.- ANTECEDENTES.

Los camarones peneidos son los principales crustáceos cultivados en el mundo, motivo por el cual han recibido la mayor atención en cuanto a experiencias de cultivo e investigación científica. Debido al desarrollo alcanzado, actualmente más de 25 especies de camarones del género *Penaeus* son cultivadas en granjas especializadas con una producción mundial, que ha incrementado su tasa media anual en 12% en los últimos años (Ramos y Molina 2001), y en el 2012 representaron el 15 % del valor total de los productos pesqueros comercializados a nivel internacional (FAO, 2014).

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

El mayor interés en la utilización de *P. vannamei* para la acuicultura ha partido de estudios en los que se ha encontrado que ésta especie tiene mejores tasas de crecimiento que otros peneidos como *L. setiferus* y *L. stylirostris* (Jiménez, 2004). Así mismo, se ha demostrado que *P. vannamei* presenta una mayor aceptación a fuentes nutricionales alternas a diferencia de otras especies. Esta tolerancia se debe en parte, a su alta capacidad para utilizar un amplio rango de proporciones proteína/energía para su crecimiento, lo que representa una ventaja técnica en cuanto a la elaboración de alimentos artificiales sobre otras especies (Gamboa, 2001; Gaxiola *et al.*, 2006; Bautista *et al.*, 2016).

2.1.- Clasificación taxonómica de *Penaeus vannamei*.

Phylum: Arthropoda

Clase: Malacostraca

Orden: Decápoda

Suborden: Dendobranchiata

Superfamilia: Penaeoidea

Familia: Penaeidae

Género: *Penaeus*

Especie: *P. vannamei*

(Pérez-Farfante, 1997).

2.2.- Camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

De manera natural, el camarón blanco es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, en aguas a temperaturas normalmente superiores a 20 °C durante todo el año (Tizol *et al.*, 2004). No obstante, debido a la actividad productiva, en la actualidad se encuentra presente en diferentes regiones del mundo (FAO., 2014), siendo los principales países productores: China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Belice, Vietnam, Malasia, P.C. de Taiwán, Islas del Pacífico, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Estados Unidos de América, India, Filipinas, Camboya, Surinam, Jamaica, Cuba, República Dominicana y Bahamas (FAO, 2008; GOAL, 2019).

2.3-. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de los peneidos (figura 1), se caracteriza por ser de tipo anfibiótico, con una fase marina y otra estuarina (Morales., 1990; Villareal & Hewitt., 1991; Marín., 2008). Durante la primera, se lleva a cabo la reproducción, la cual se realiza en aguas alejadas de la costa. En esta fase, el macho deposita en la hembra un paquete de esperma (espermátforo) que fertilizará a los huevos (óvulos) a medida que estos sean liberados en la columna de agua (CPC, 1989; Usatorres *et al.*, 1991). Posteriormente, los huevos (0.039 cm de diámetro) maduran en aproximadamente 14-16 horas y pasarán a través de una serie de estadios larvales denominados: Nauplio (N), Zoea (Z) y Mysis (M), los cuales se caracterizan por ser planctónicos y con fototropismo positivo (Dall *et al.*, 1990; Martínez *et al.*, 1998).

Posterior a esta serie de metamorfosis, las larvas son arrastradas por las corrientes y mareas hacia la costa, hacia zonas someras, dando así paso la fase estuarina, donde llegan como postlarvas y presentan el cuerpo horizontal característico del grupo (García & Le-Restre., 1986). En esta fase, estos organismos encontrarán una mayor disponibilidad de alimento (zooplancton, detritos y materia orgánica en descomposición), una baja salinidad, mayores temperaturas y una mayor protección contra depredadores (Chaves., 2001).

Durante la fase estuarina, las postlarvas presentan una vida bentónica (organismos del fondo), atravesando una acelerada fase de crecimiento y sucesivas mudas, dando paso así a la etapa juvenil (3-4 meses) (Alcántara., 2005, García & Le-Restre., 1986). Conforme el camarón incrementa su talla (de sub adulto / inmaduro), este regresa gradualmente a mar adentro hacia zonas de apareamiento (12-80 m de profundidad) en respuesta a factores endógenos y exógenos, llegando así a la etapa adulta, cuando son sexualmente maduros (Gulland & Rothschild., 1984; Hendrick., 1995; Lee., 1999; Wouters *et al.*, 2001).

Una vez que llegan en las zonas de apareamiento, el desove tiene lugar en la temporada cálida, donde el número de huevos por cada hembra madura fluctúa entre 200,000-500,000

(Cifuentes *et al.*, 1997). El ciclo de vida normal del camarón tiene una duración de 12 meses aproximadamente, pero algunos llegan a vivir hasta 2 años (FAO., 1987).

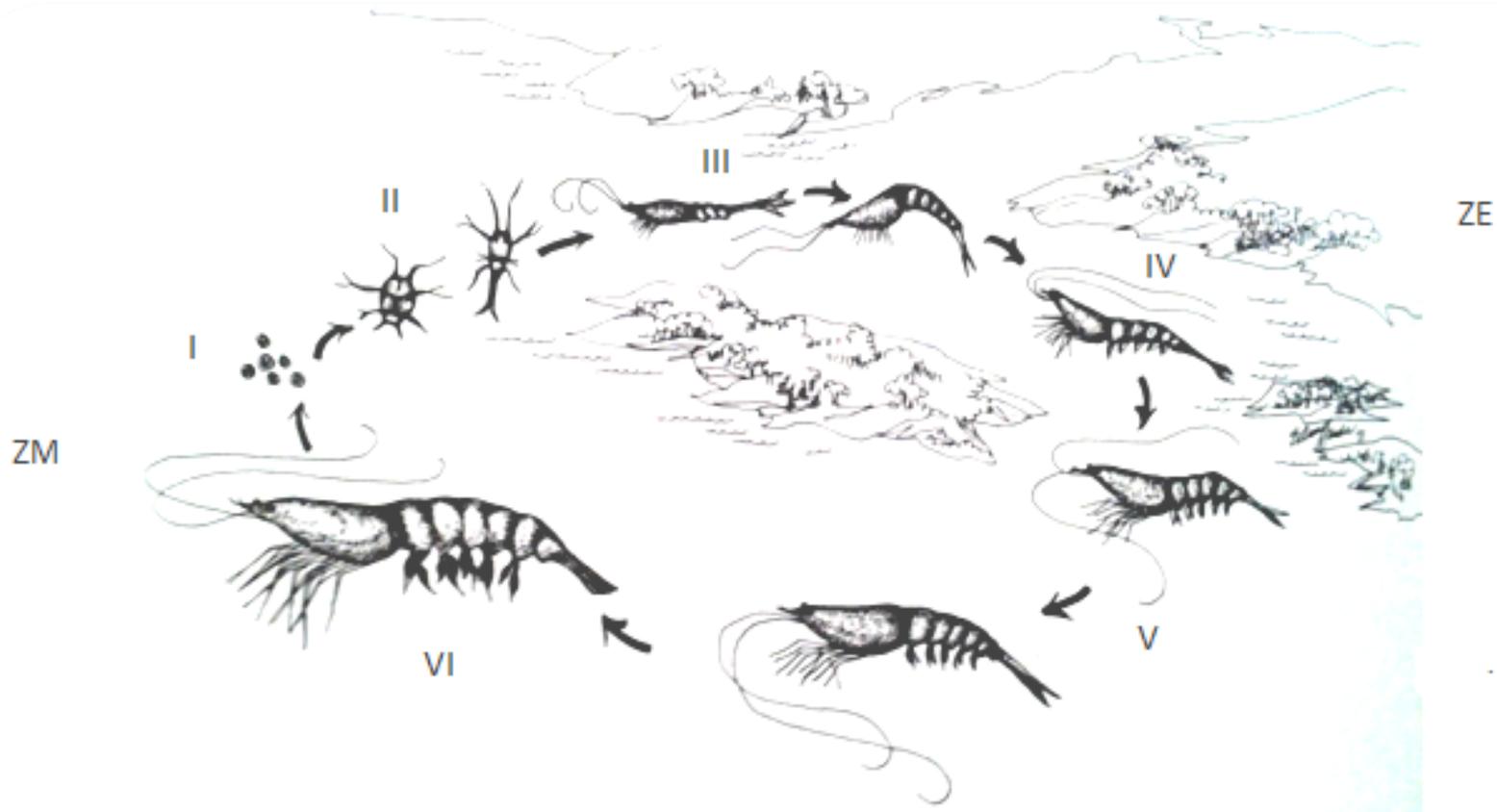


Figura 1. Ciclo de vida de camarones Fast & Lester., 1992). Zona marina (ZM), zona estuarina (ZE), huevos (I) larvas (II), postlarvas (III), juveniles (IV), sub-adultos (V) y adultos (VI).

2.4.- Hábitos alimentarios.

Los camarones son considerados organismos filtradores, predadores y carroñeros; además, el tipo de alimento que consumen es diferente durante su ciclo de vida (planctónico o bentónico) (Cruz., 1991). Una correlación entre el cambio ontogenético en la actividad enzimática y la variación en el patrón alimenticio en camarones peneidos ha sido ampliamente aceptada (Rothschild & Brunnenmeister, 1984; Ribeiro & Jones., 2000).

La alimentación de postlarvas, juveniles y adultos está constituida por una gran cantidad de alimento de origen vegetal, animal y detritos orgánicos (Morales., 1990; Perera *et al.*, 2005). Y su inclinación hacia la carnivoría o la herbivoría es afectada de acuerdo al ambiente en el que se encuentran (marino o estuarino) y al tipo de alimento disponible (Forrellat *et al.*, 2004).

Los nutrientes presentes en el alimento son un factor determinante para el desarrollo óptimo del camarón. Gracias a estos nutrientes, estos animales pueden obtener la energía necesaria para transformarla en biomasa (Tacon., 1989; Rosas *et al.*, 2002). Dentro de los nutrientes presentes en el alimento natural, el contenido de proteína, carbohidratos, lípidos (particularmente ácidos grasos HUFA's), vitaminas y minerales, son vitales para el desarrollo del camarón (Cruz *et al.*, 2000; Gatlin., 2002). De forma general, estos nutrientes han sido asociados con diferentes niveles de crecimiento y con la composición bioquímica de los organismos (Tacon., 1989).

Martínez *et al.*, (2009) reportan que la calidad de estos nutrientes también juega un papel importante (específicamente los lípidos y los carbohidratos), ya que, al no estar en su nivel óptimo, las células usarán la energía de los aminoácidos destinados al crecimiento, retrasando así su ciclo de desarrollo. Por otra parte, si la proteína no tiene el perfil de aminoácidos (aa) requerido, parte de estos serán utilizados como energía y no como sustrato para el crecimiento.

2.5.- Acuicultura de *Penaeus vannamei*.

La acuicultura es una industria que se ha convertido en una de las alternativas con mayor viabilidad económica para la producción de alimento, apoyándose en técnicas y procesos sobre los cuales se cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004 en Godínez *et al.*, 2011). En México, la pesca de camarón en mar abierto en los últimos 9 años ha disminuido, pasando de 42,950 ton (peso vivo) en 2011 a 29,734 ton (pv) en 2020, lo que representó una disminución del 31% (CONAPESCA, 2020). Ante este panorama y como respuesta a la demanda del recurso, se ha recurrido al cultivo (Martínez-Córdova *et al.*, 2009; González *et al.*, 2011), actividad que, por el contrario, pasó de 109,815 ton a 214,544 ton en el mismo periodo de tiempo, lo que representó un aumento en la producción acuícola mexicana del 195% (CONAPESCA, 2020).

Este crecimiento ha posicionado a la camaronicultura mexicana en el segundo lugar como productor en América Latina después de Ecuador, que es el cuarto productor mundial de este crustáceo (Arredondo *et al.*, 2002; WWF, 2016; Gonzabay-Crespin *et al.*, 2021). Si bien la actividad acuícola se ha desarrollado en los últimos años, la producción está sujeta a grandes variaciones tanto por amenazas en la producción por la incidencia de enfermedades masivas, como en la comercialización por una competencia con el camarón de origen asiático (Norzagaray *et al.*, 2012).

El camarón blanco del pacífico (*Penaeus vannamei*) es la especie más cultivada en el mundo, desde que China cambió su producción de camarón basada en las especies nativas de Asia (Gaxiola *et al.*, 2006). Esto responde, a que es una especie que tolera bajas temperaturas, alta salinidad, se adapta bien al cultivo, madura y desova fácilmente en cautiverio y tiene buen mercado internacional (Arredondo *et al.*, 2002). Así mismo, en México el cultivo de camarón se encuentra sostenido por la especie *P. vannamei* (camarón blanco). Esta actividad se realiza mediante diversos sistemas de producción los cuales se clasifican en extensivo, semi-intensivo e intensivo (FAO., 2008). La diferencia principal en estas técnicas es el número de

organismos (densidad) por metro cuadrado y a la calidad y cantidad de alimento suministrado (Arzola *et al.*, 2008).

2.6.- Sustitución de la harina de pescado.

El alimento representa hasta el 50 % de los costos de producción en la acuicultura (Mohamed *et al.*, 2014), y las características del alimento (atractabilidad, palatabilidad, textura e hidroestabilidad) son factores críticos para obtener tasas máximas de ingestión que permitan cubrir los niveles de nutrientes requeridos y lograr el máximo crecimiento (Cruz *et al.*, 2000; Morais y Derby, 2019).

En la fabricación de alimentos acuícolas la harina de pescado es el insumo más utilizado por presentar un equilibrio de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales necesarios para los organismos acuáticos (Gatlin., 2002; Huntington y Hasan, 2009; Qui., 2015), además de que posee una alta digestibilidad en relación a otras fuentes proteínicas (Liu *et al.*, 2009). Este insumo, puede ser de peces capturados especialmente para la elaboración de harina, desechos de la industria del pescado, peces grasos y peces magros; la harina se puede elaborar a partir de una sola especie o varias (Fenucci *et al.*, 2007; Huntington y Hasan, 2009). Sin embargo, por su elevado costo y menor disponibilidad a través de la disminución actual de las pesquerías mundiales, además del mayor aprovechamiento de especies pesqueras para consumo humano, la harina de pescado actualmente representa el cuello de botella económico de las formulaciones industriales (Bonaldo, 2013; Von *et al.*, 2015). Lo cual, ha sido la principal motivación de los investigadores en la búsqueda de nuevas fuentes de proteína que puedan sustituir a la harina de pescado, permitiendo formular un alimento balanceado de bajo costo (Bernal *et al.*, 2007).

Debido a la disponibilidad y a la importancia del uso de subproductos (tejidos cárneos, hueso, sangre, viseras y plumas), éstos han sido contemplados en la alimentación de organismos

acuáticos (García-Galano *et al.*, 2007; Luchini & Wicki., 2013). De igual forma, las harinas vegetales provenientes de la soya, canola, trigo, lupino, maíz, etc., han sido evaluadas como una alternativa para la sustitución parcial y/o total de la harina de pescado (Olvera *et al.*, 2000; Oujifard *et al.*, 2012). Los diferentes niveles de inclusión de proteína vegetal en los alimentos acuícolas depende de la especie, talla del organismo y hábitos alimenticios (Davis *et al.* 2002).

En particular en los camarones peneidos, García *et al.*, (2007) reportan que se han evaluado diversas fuentes de proteína animal (harina de pescado, calamar, camarón, krill, langostilla, subproductos cárnicos y subproductos avícolas), vegetal (harina de soya, algodón, trigo, sorgo, amaranto, colza, lupino, harina de quinua y harina de maíz) y de microorganismos (levaduras y microalgas), con resultados variables según el nivel de inclusión y estadio de los camarones. En la tabla 1, se presentan algunos estudios con los ingredientes y su nivel de sustitución de la harina de pescado en la alimentación de *Penaeus vannamei*.

Tabla 1. Estudios de sustitución de harina de pescado.

Insumo	Nivel de inclusión	Resultados
Harina de carne y hueso ¹	25-45%	Crecimiento y supervivencia óptima.
Harina de Langostilla ²	35-45%	Mejoro el crecimiento y conversión alimenticia.
Harina de Calamar ³	5%	Mejoro el crecimiento.
Subproductos de aves ⁴	11-21.6	No afecto el crecimiento y la supervivencia.
Hidrolizado de pluma ⁵	20%	No afecto el crecimiento y la supervivencia.
Harina de quinua ⁶	11-45%	No afecto el crecimiento.

¹Hernández *et al.*, 2004; ²Gutiérrez., 2002; ³Córdoba y García., 2001; ⁴Davis y Arnold, 2000; ⁵Mendoza *et al.*, 2001; ⁶Cárdenas, 2004.

Estas alternativas pueden satisfacer los requerimientos nutricionales del camarón en cultivo, así como, también minimizar los costos de producción optimizando el proceso.

2.7.- Fuentes vegetales.

El uso de fuentes vegetales representa una alternativa a los altos precios y baja disponibilidad de la harina de pescado (Denstadli *et al.*, 2007). Dentro de los ingredientes vegetales, la soya es cada vez más común en la alimentación de organismos acuáticos por su composición química, perfil de aminoácidos, con excepción de la metionina y en menor grado la lisina como aminoácidos limitantes (Martínez *et al.*, 1999). Olimpia *et al* (2007), presenta un resumen (Tabla 2) de los estudios de reemplazo de la harina de pescado con harina de soya.

Tabla 2. Estudios de inclusión de soya como reemplazo de harina de pescado

Especie	Tipo de sustitución	Resultados
<i>F. californiensis</i> ¹	50% de sustitución de harina de pescado y harina de calamar.	Mayor tasa de crecimiento y mejor factor de conversión.
<i>L. setiferus</i> y <i>L. stylirostris</i> ²	50% de sustitución harina de calamar.	Mejor tasa de crecimiento, supervivencia y factor de conversión.
<i>P. vannamei</i> , <i>F. aztecus</i> , <i>F. duorarum</i> , <i>L. setiferus</i> , <i>L. schmitti</i> y <i>L. stylirostris</i> ³	10% de inclusión en dietas comerciales, y 40-50% en dietas de laboratorio.	No se determinaron diferencias significativas (p>0.05) en el crecimiento y supervivencia.
<i>Penaeus vannamei</i> ⁴	40/60 soya/calamar.	No presentaron diferencias significativas (p>0.05) en los tratamiento.
<i>Litopenaeus schmitti</i> ⁵	25-35% de inclusión de harina de soya en dietas a base de harina de pescado.	Mejor factor de conversión.

¹Colvin y Brand (1977); ²Fenucci et al., (1982); ³Lawrence et al., (1986); ⁴Dominy y Lim. (1993); ⁵Álvarez et al. (2003). Estas investigaciones demuestran el potencial de la pasta de soya desgrasada, como un sustituto a la proteína de origen animal en diferentes niveles de inclusión en peneidos.

Tacón *et al.*, (1983) plantearon como alternativa a la deficiencia de metionina y lisina en la harina de soya, el uso de otra fuente proteínica como la canola (*Brassica sp.*), que actuaría como suplemento. La harina de canola comprende entre el 50 y 60% del peso de la semilla, cuyo contenido de proteína oscila entre 37 y 40%. Por la calidad de los aminoácidos que componen la proteína, su harina se puede comparar con la de soya (Molina y Lucas, 2007). Así mismo, la harina de canola está bien establecida como un ingrediente en alimento para salmón y trucha, donde ha sido rutinariamente usada durante 20 años (Higgs *et al.*, 1996).

En la tabla 3, se presentan estudios de inclusión de harina de canola, en sustitución a la harina de pescado en la nutrición de los camarones peneidos.

Tabla 3. Estudios de remplazo de harina de pescado por harina de canola.

Especie	Tipo de sustitución	Resultados
<i>P. monodon</i> ¹	20% de sustitución de harina de calamar.	Reflejaron un efecto positivo al obtener mayor peso, en comparación con la dieta basal.
<i>L. stylirostris</i> ²	30% de sustitución de harina pescado por harina canola.	No reportaron diferencias significativas ($p>0.05$) respecto a la dieta control en el crecimiento de juveniles.
<i>Penaeus vannamei</i> ³	25% de inclusión harina de canola.	No presentaron diferencias ($p>0.05$) en crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia.

¹Buchanan *et al.*, (1997); ²Cruz *et al.*, (2001); ³Davis *et al.*, (2002).

Estos estudios en conjunto permiten evidenciar el potencial de las fuentes de proteína vegetal como una alternativa a la sustitución parcial o total de la harina de pescado. Jiménez-Yan *et al.*, (2006), Cuzon *et al.*, (2003) y Gaxiola *et al.*, (2005) han demostrado que al menos en la fase postlarval, *P. vannamei* no presentó diferencias significativas en supervivencia y crecimiento con alimentos balanceados con una sustitución hasta del 90% de proteína animal marina, por combinaciones de fuentes de proteína de origen vegetal.

Sin embargo, el uso de fuentes vegetales (soya y canola) en la industria acuícola presenta un inconveniente, el cual está relacionado con los factores antinutricionales (antitripticos, antiqumotrípticos, fitatos, lectinas y taninos) que afectan su valor nutricional y reducen la palatabilidad de los alimentos cuando se preparan con niveles altos de proteína vegetal (Carrillo *et al.*, 2007; Molina & Lucas., 2007; Adeyemo & Onilude, 2013). El tratamiento con calor (tostado, extrusión y peletizado) inactivan o eliminan exitosamente estos antinutrientes a excepción del fitato o ácido fítico (Lim & Akiyama, 1992; Carrillo *et al.*, 2007); el cual presenta una alta afinidad por componentes con carga positiva (iones positivos), debido a su alta carga negativa en un amplio rango de pH (Greiner & Konietzny, 2006). Por lo cual, es considerado como un factor antinutricional, por su acción quelante de minerales y la interacción con proteínas (Guerrero *et al.*, 2007), convirtiéndolos en no asimilables para el organismo bajo ciertas condiciones fisiológicas (Martínez *et al.*, 2002).

2.8.- Ácido Fítico.

El ácido fítico (hexafosfato de inositol, IP6) y sus sales (fitatos), constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en semillas de cereales y leguminosas (Ullah *et al.*, 2008), representando aproximadamente entre 50 y 80% del fósforo total del grano (Vohra *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006).

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

Ca²⁺ o el Mg²⁺, puede inducir la formación de un complejo ternario. A valores de pH elevado, superiores a 10, la interacción entre las proteínas y el AF disminuye, rompiendo la unión fitato-cación-proteína (Gómez, 2005).

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

En particular, en la alimentación de camarones Civera y Guillaume (1989) evidencian un efecto negativo en el crecimiento, aumento en consumo de alimento y en la tasa de conversión alimentaria; al incorporar fósforo fítico en dietas para *Marsupenaeus japonicus* y *P. vannamei*. Davies y Lawrence (1993) determinan que al incorporar el 1.5% de fitato en dietas para *P. vannamei*, existe una disminución de niveles de zinc y fósforo en el hepatopáncreas. Así mismo, Kumaraguru *et al.*, (2007) establecieron la presencia de anomalías en el hepatopáncreas (ampliación de vacuolas de las células B) de organismos de *P. monodon* alimentados con fuentes vegetales no tratadas para eliminar factores antinutricionales como: fitatos, inhibidores de tripsina, saponinas y compuestos polifenólicos.

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

2.9.- Fitasa.

Las investigaciones con este tipo de enzimas (fitasas) iniciaron hace más de 87 años y fueron descubiertas por Suzuki *et al.*, (1907). Esta es una de las primeras enzimas descritas que liberan fosfato inorgánico de los compuestos orgánicos fosforilados y está ampliamente distribuida en la naturaleza derivada de fuentes como plantas, animales y microorganismos (Fu *et al.*, 2007), las cuales catalizan la hidrólisis del ácido fítico a inositol y ortofosfato libre (Peers, 1953).

La fitasa (myo-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6) hexaquisfosfato fosfohidrolasas, EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26 y EC 3.1.3.72), pertenecen a un subgrupo de fosfatasas con un peso molecular estimado de 35-700 kDa, dependiendo la fuente de origen (Greiner y Konietzny, 2006), y se clasifican en cuatro categorías principales: las fosfatasas ácidas de histidina (HAP), fitasas con estructura de hélice, cisteín fitasas y fitasas ácidas púrpuras (Lei *et al.*, 2007). Alternativamente, en base a la posición del carbón donde se inicia la remoción de los grupos fosfato en el fitato se clasifican en tres grupos: las 3-fitasas (también llamadas 1-fitasas, EC 3.1.3.8), 4-fitasas (también llamadas 6-fitasas, EC 3.1.3.26) y 5-fitasas (EC 3.1.3.72) de acuerdo a la base de datos ENZYME (disponible a través del servidor de proteómica ExPASy; <http://www.expasy.ch/enzyme>).

Martínez *et al.*, (2002) propusieron el uso de fitasas exógenas en los alimentos acuícolas como una estrategia implementada para la utilización de fósforo fítico y otros nutrientes que se encuentran quelados por el ácido fítico “AF”. La hidrólisis del AF durante la digestión o durante el procesamiento del alimento mediante la acción de las fitasas de origen endógeno o exógeno, mejora en proporciones variables la absorción y retención del P, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y aminoácidos (Rebollar y Mateos, 1999; Gómez-Villalva 2005), permitiendo de esta manera, reducir hasta un 50% la contaminación ambiental por minerales al utilizar las fitasas (Harter-Denis, 1999; Acosta *et al.*, 2006).

En estudios con camarones peneidos, Divakaran y Ostrowski (1998) evaluaron la digestibilidad *in vitro* de la harina de soya, así como el efecto de la interacción entre la fitasa, la tripsina y α -amilasa de *Penaeus vannamei*, indicando que la actividad de las enzimas incrementa directamente proporcional con el aumento de unidades de fitasa, la cual ejerce un efecto positivo en la hidrólisis de proteína. De igual manera, Biwsas *et al.*, (2007) determinaron que al suplementar lisina y fitasa en dietas a base de soya se reduce la carga de nitrógeno y fósforo en los sistemas de cultivo de *Penaeus monodon*.

A pesar de los resultados positivos obtenidos hasta el momento en el empleo de fitasa en la alimentación de diferentes especies en la industria acuícola, es necesario optimizar las características de las fitasas para una aplicación específica, ya que las fitasas que actualmente están disponibles de forma comercial, han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves (Guerrero *et al.*, 2008). Un ejemplo de fitasa comercial es la fitasa RonozymeTM P (CT) 5,000, la cual es un producto de la casa comercial DSM (Nutricional Products), formulada con una enzima fitasa derivada de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae*, presenta un rango de actividad enzimática de pH 4-7 (Hernández, 2010).

Sin embargo, de acuerdo a las características fisiológicas del camarón, las fitasas adecuadas para la alimentación de esta especie deberían tener actividad a valores de pH de 7 a 8, a un intervalo de temperatura de 26-32°C, debido a las condiciones presentes en el aparato digestivo y en el medio de cultivo. Se requiere que éstas posean resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas del camarón, estabilidad a las temperaturas empleadas en el procesado de los alimentos y una baja lixiviación de la fitasa presente en las preparaciones extruidas e introducidas en el medio acuoso de los tanques (Guerrero *et al.*, 2008). Por lo cual, la fitasa FTEII pudiera representar una alternativa en la alimentación de camarón (Hernández, 2010; Gamboa, 2011), la cual es una forma recombinante producida por *Pichia pastoris* (con actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 9, y actividad máxima en un intervalo de temperatura de 25°C a 80°C), producida en el Instituto de Biotecnología,

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Viader *et al.*, 2010).

El valor potencial de la fitasa en dietas con proteína vegetal, estriba en permitir que la fitasa reemplace la suplementación de fósforo (P) inorgánico, se reduzcan los costos de producción y disminuyan los niveles de fósforo excretado por los animales (hasta en un 50%), con lo cual se minimicen los efectos negativos en el ambiente (Phillippy, 1999). Es importante que a través de la hidrólisis del AF sean cubiertos los requerimientos de fósforo, ya que es un componente básico de los ácidos nucleicos y ATP, esencial para el crecimiento, el mantenimiento de la homeostasis mineral y en su participación en la mayoría de las reacciones metabólicas (Cabrera *et al.*, 2002).

III.- JUSTIFICACIÓN.

Se propone el desarrollo de un alimento a base de fuentes de proteína vegetal, con la inclusión de fitasas exógenas que sean adecuadas para la especie y que replacen la suplementación de fósforo (P) inorgánico en la dieta, reduciendo así la cantidad de fósforo excretado por los camarones. Esto contribuirá a minimizar los problemas de eutrofización en los sistemas acuáticos en relación a este mineral (Phillippy, 1999).

IV.- PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN.

- 1.- ¿El ácido fítico que contienen las harinas vegetales puede ser fuente de fósforo en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*?
- 2.- ¿Existe una actividad de fosfatasa alcalina en el hepatopáncreas de los juveniles de *P. vannamei* capaz de hidrolizar por sí sola el ácido fítico de las harinas vegetales?
- 3.- Si es necesario usar fitasa exógena para hidrolizar el ácido fítico que contienen las harinas vegetales, ¿cuál sería la mejor para los juveniles de *P. vannamei*?
- 4.- ¿El ácido fítico presente en las harinas vegetales es capaz de inhibir la actividad de las enzimas digestivas de los juveniles de *P. vannamei*?

V.- HIPÓTESIS GENERAL

Desde hace 30 años los camarones han sido alimentados con productos balanceados, en los que se han incluido fuentes de origen vegetal como la harina de soya (Naylor *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha detectado un retardo en las tasas de crecimiento de los juveniles alimentados con dietas con más de 25% de proteína proveniente de la pasta de soya. *P. vannamei* ha respondido de igual forma. Este retardo puede ser producto de la presencia de factores antinutricionales como el fitato.

Por otro lado, Hunter y Feller 1987; Cuzon *et al.*, 1997 en Maldonado 2006, mencionan que los camarones peneidos mantienen un hábito omnívoro/herbívoro. Por lo tanto, se espera que sea capaz de digerir y asimilar proteínas de origen vegetal como la pasta de soya y canola, con la presencia de enzimas exógenas capaces de hidrolizar un compuesto como el fitato.

VI.- OBJETIVOS.

6.1.- Objetivo general.

Evaluar el efecto de la enzima fitasa exógena sobre la zootecnia, fisiología digestiva, bioenergética, textura e indicadores inmunológicos de los juveniles de *P. vannamei*, alimentados con dietas formuladas con una mezcla de pasta de soya y de canola.

6.2.- Objetivos particulares.

- a) Evaluar el efecto en el crecimiento, la supervivencia, la bioenergética y la actividad de las enzimas digestivas de los juveniles de *P. vannamei* alimentados con dietas a base de proteína vegetal, en los que se incluyeron dos fitasas: un pretratamiento de las harinas vegetales con una fitasa experimental (FTEII) y la inclusión directa de una fitasa comercial (Ronozyme P5000 CT) en el alimento balanceado.
- b) Determinar la digestibilidad aparente (fósforo, materia seca y proteína) y cantidad de fósforo circulante en la hemolinfa de juveniles de *P. vannamei* alimentados con dietas a base de proteína vegetal, en las que se han incluido los dos tipos de fitasa (FTEII-Ronozyme P5000 CT) y una Premezcla de minerales libre de fósforo.
- c) Determinar el efecto de la alimentación con dietas a base de proteína vegetal e inclusión directa de fitasa Ronozyme P5000 CT, fósforo dicalcio y betaina. en el crecimiento, la supervivencia, la bioenergética, la actividad de las enzimas digestivas, la textura, mOs, SOD y conteo de hemocitos totales en los juveniles de *P. vannamei*

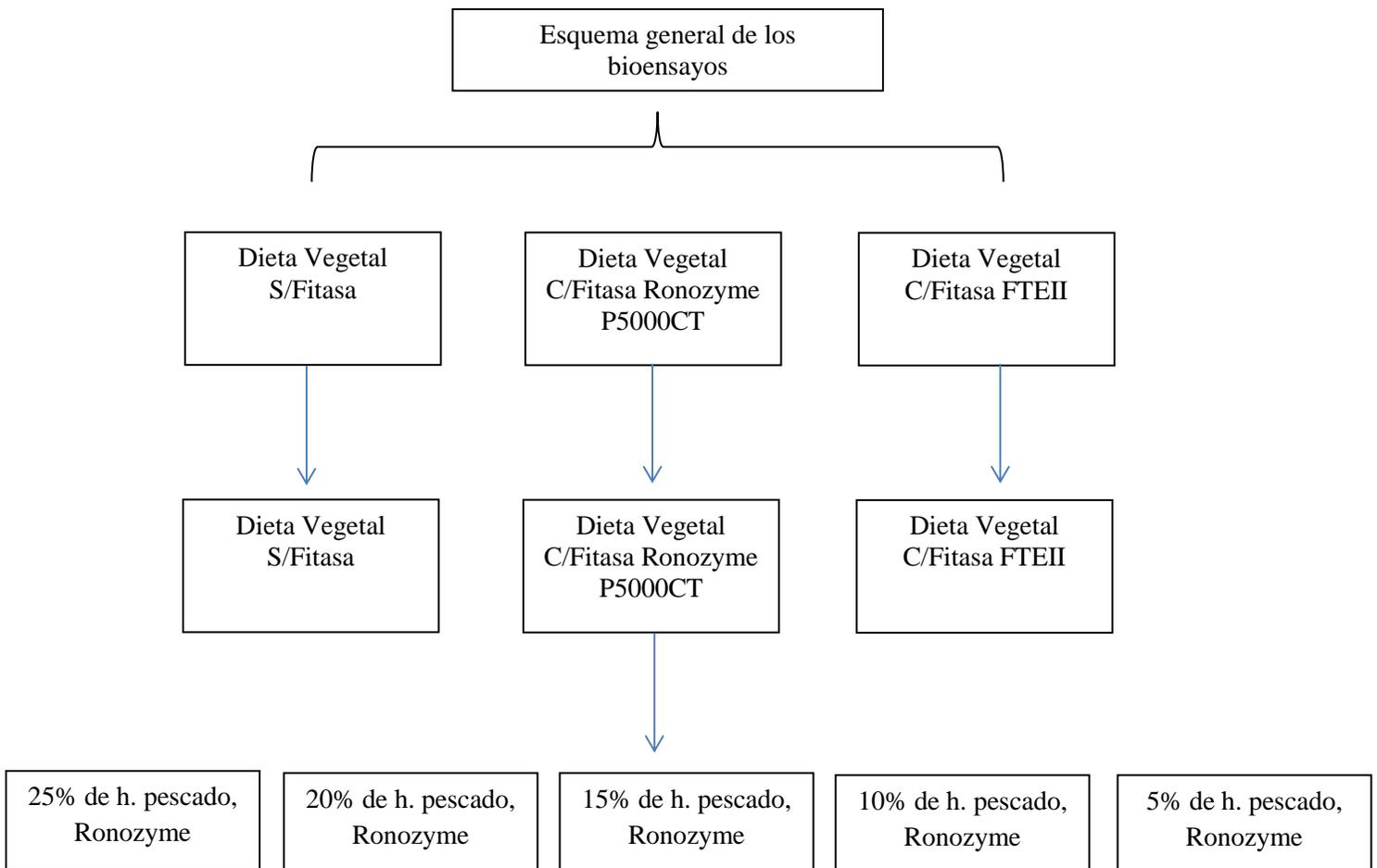
VII.- ESQUEMA GENERAL DE LOS BIOENSAYOS.

El presente estudio se dividió en tres bioensayos:

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

*Bioensayo 2. Evaluación de la fitasa en dietas vegetales (soya y canola) libres de la incorporación de fosforo inorgánico (Premix).

*Bioensayo 3. Evaluación de la sustitución parcial de la harina de pescado por harina de soya y canola, y la inclusión de fitasa y fosfato de calcio.



CAPÍTULO 1

BIOENSAYO 1

INCLUSIÓN DE FITASA (FTEII Y RONOZYME P5000 CT) EN DIETAS VEGETALES (SOYA Y CANOLA) DE JUVENILES DE CAMARÓN *P. vannamei*

VIII. INCLUSIÓN DE FITASA (FTEII Y RONOZYME P5000 CT) EN DIETAS VEGETALES (SOYA Y CANOLA) DE JUVENILES DE CAMARÓN.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la sustitución de la harina de pescado por fuentes de proteína vegetal (soya y canola) y fitasa exógena en dietas, sobre variables zootécnicas en juveniles de *P. vannamei*. Se evaluaron tres tratamientos; T₁ (Control; libre de fitasa), T₂ (dieta basada en harinas vegetales con fitasa Ronozyme P5000 CT) y T₃ (dieta con fitasa FTEII). La supervivencia fue similar en los tres tratamientos ($p > 0.05$) en comparación con el peso promedio y SGR, donde T₂ y T₃ presentaron los mayores valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) comparados con el T₁. Por otra parte, no se observaron diferencias ($p > 0.05$) en la concentración de proteínas solubles proveniente del hepatopáncreas de los camarones sometidos a los diferentes tratamientos. La actividad de tripsina fue mayor en T₁ y T₃ ($p < 0.05$), y la actividad de la quimotripsina fue mayor en T₂ ($p < 0.05$). En el balance bioenergético los valores de energía basal (HeE) fueron similares en los tres tratamientos ($p > 0.05$), a diferencia del aumento en el incremento de calor aparente (HiE), donde T₁ y T₂ fueron superiores al T₃ ($p < 0.05$). En el caso de la energía retenida (RE), el T₂ y T₃ presentaron los mayores valores en comparación con el T₁ ($p < 0.05$). Los resultados demuestran que la inclusión de fitasa exógena en dietas a base de proteína vegetal disminuyó los efectos negativos del ácido fítico y se promovió el crecimiento de los camarones.

8.1.1- INTRODUCCIÓN.

Se ha mencionado que el incremento en la demanda de recursos pesqueros para consumo humano directo o para la obtención de insumos y subproductos para distintas industrias, ha provocado un aumento en los precios de los recursos disponibles (Allsopp *et al.*, 2013; Oujifard *et al.*, 2012; Chowdhury *et al.*, 2014). Esta problemática ha tenido como consecuencia el incremento en el esfuerzo de investigación para encontrar fuentes alternativas a la harina o aceite de pescado, insumos comúnmente utilizados como fuente proteica para la elaboración de alimentos destinados a la industria acuícola (Martínez-Cordova *et al.*, 2009; Luthada-Raswiswi *et al.*, 2021).

En la camaronicultura, la investigación para la inclusión de fuentes vegetales para la sustitución de la harina de pescado ha presentado avances en la especie *P. vannamei*, gracias a los hábitos alimenticios de ésta en sus diferentes etapas de desarrollo (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003; Gaxiola *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2010; Díaz., 2012; Sun *et al.*, 2015) ;

No obstante, uno de los principales aspectos contraproducentes en el uso de harinas vegetales, son los factores antinutricionales o ANF por sus siglas en inglés (anti-nutritional factors), los cuales están presentes en harinas de soya, canola, lupino, trigo, arroz y maíz (Rodiles *et al.*, 2009; Enami., 2011; Oujifard *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2014), debido a que reducen la palatabilidad (Olvera *et al.*, 2000), inhiben vías metabólicas específicas, y disminuyen la digestibilidad y la absorción de nutrientes (Bharadwa *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2014). Ante esto, se ha mencionado que algunos de estos ANF presentes en las harinas vegetales como los inhibidores de proteasas, saponinas, taninos, alcaloides, glucocinatos, antivitaminas, lectinas y fitatos (Francis *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2015) se pueden eliminar o disminuir a través de diferentes procesos mecánicos, térmicos, químicos y biológicos (Adeyemo & Onilude., 2013; Tchikoua *et al.*, 2015; Muhammad *et al.*, 2015).

El presente estudio se enfocó sobre el fitato como el elemento ANF limitante para la sustitución parcial y/o total de la harina de pescado por fuentes vegetales (soya y canola) en alimentos prácticos para juveniles de *P. vannamei*.

El fitato o (ácido fítico) es un componente esencial de todas las semillas y constituye una reserva de fósforo (P) y otros minerales que se liberarán durante la germinación (Rebollar & Mateos., 1999). Según el modelo propuesto por Anderson en 1914, el fitato es una molécula con seis grupos ortofosfato (InsP6), de nombre químico *myo-inositol* 1, 2, 3, 4, 5, 6 – *hexaquis* (dihidrógeno fosfato), que tiene la característica de ser una molécula cargada negativamente en un amplio espectro de pH (ácido, neutro y básico), por lo que es una molécula muy reactiva (Woyengo & Nyachoti., 2012) que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas (Martínez *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2015), esenciales en la nutrición de los organismos monogástricos que carecen o presentan baja actividad de fitasa endógena (Fortes-Silva *et al.*, 2009).

Una estrategia que se ha planteado para hidrolizar el ácido fítico y sus sales es la adición de fitasas exógenas en el alimento (Becker., 2011; Qui., 2015), ya sea con la inclusión de manera directa como microencapsulados para que se activen y funcionen en el tracto digestivo de los organismos (Von-Danwitz *et al.*, 2015; Suprayudi *et al.*, 2012), o en un pretratamiento de las harinas, incubando previamente las materias primas con la enzima (Nwana *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012; Xue., 2015).

Las fitasas (EC 3.1.3.8), son una clase especial de fosfatasa que catalizan la hidrólisis secuencial de *myo*-inositol- (1, 2, 3, 4, 5, 6) -hexaquisfosfato o ácido fítico (InsP6) a los derivados de *myo*-inositol menos fosforilados y fosfato inorgánico (Zhu *et al.*, 2015; Rutherford *et al.*, 2012) reduciendo las propiedades antinutricionales de ácido fítico y la eutrofización, causada por la excreción de ácido fítico no digerido (Beslin., 2014; Belgaroui *et al.*, 2014).

8.1.2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe una actividad de fosfatasa alcalina en el hepatopáncreas de los juveniles de *P. vannamei* capaz de hidrolizar por sí sola el ácido fítico de las harinas vegetales?

8.1.3.- HIPÓTESIS.

Si no existe una actividad de fosfatasa alcalina en el hepatopáncreas de los juveniles de *P. vannamei* capaz de hidrolizar por sí sola el ácido fítico de las harinas vegetales, entonces la inclusión de fitasa exógena en las harinas vegetales promoverá la hidrolisis del fitato disminuyendo su efecto antinutricional, reflejándose en un efecto positivo en los parámetros zootécnicos de juveniles de *P. vannamei*

8.1.4.- OBJETIVO.

Evaluar el efecto de reemplazar la harina de pescado por fuentes de proteína vegetal (soya y canola) y el efecto de incluir fitasa exógena en dietas para juveniles de *P. vannamei*.

8.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

8.2.1.- Dispositivo Experimental.

El diseño para el experimento fue completamente aleatorizado con 3 tratamientos y 6 réplicas por tratamiento, donde se usaron juveniles ($7.2 \pm 0.6\text{g}$) de *Penaeus vannamei*, los cuales se obtuvieron de la granja LA MARCA ubicada en Sisal, Yucatán, México. Los juveniles fueron mantenidos durante 40 días (10 aclimatación y 30 periodo experimental) en un sistema de recirculación, en condiciones controladas de cultivo (tanques de 200 L, a una densidad de 15 camarones por tanque), y alimentados con tres tratamientos (ver tabla 3): dieta vegetal con fitasa Ronozyme P5000 CT (T_2), dieta vegetal con fitasa FTEII (T_3), las cuales son comparadas contra una dieta control elaborada con fuentes de proteína vegetal sin inclusión de fitasa (T_1).

8.2.2- Composición de las dietas.

En la tabla 4, se presenta la formulación de las dietas (T_1 , T_2 y T_3) empleadas durante el bioensayo.

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

Tabla 4. Formulación de dietas para el bioensayo.

Materias Primas	T ₁ g/100g	T ₂ g/100g	T ₃ g/100g
Harina de pescado	5	5	5
Concentrado proteico de soya ¹	27	27	27
Pasta de soya	22	22	22
Pasta de canola	22	22	22
L-lisina	0.9	0.9	0.9
DL- metionina	0.7	0.7	0.7
Aceite de Pescado ³	8	8	8
Colesterol	0.1	0.1	0.1
Almidón de trigo	9.3	9.3	9.3
Premezcla de vitaminas y minerales ²	2.5	2.5	2.5
Carboximetil celulosa	1	1	1
Zeolita ⁴	1.45	1.45	1.45
Ronozyme ⁵	0	0.05	0
Relleno	0.05	0	0.05
Total	100	100	100

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

Las harinas (canola y soya) del T₃ fueron pretratadas con una enzima fitasa FTEII, la cual es una forma recombinante producida por *Pichia pastoris* (1080 U/mL, actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 9, y actividad máxima en un intervalo de temperatura de 25°C a 80°C), producida en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Viader *et al.*, 2010).

Así mismo, siguiendo el protocolo descrito por Nwanna *et al.*, (2007), ambas harinas (220 g de soya y 220 g de canola) se incubaron durante 15.5 horas a 50°C en una relación 1:1.5 (harina: agua), con la inclusión de 1.6 U de fitasa (FTEII) por gramo de harina vegetal tratada. Para posteriormente secarlas por 12.5 horas a 60°C, con la finalidad de eliminar la humedad y permitir su fácil homogenización con el resto de los ingredientes hasta formar una pasta que también fue peletizada, como en el caso de los tratamientos T₁ y T₂.

Por otro lado, la fitasa granular Ronozyme P5000 CT fue incluida en la dieta (T₂) junto con los ingredientes secos. En la cual se incluyó 0.5g de fitasa (2500 U) por kilogramo de alimento. La fitasa granular RonozymeTMP5000 CT, es una enzima fitasa derivada de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae*. El rango de pH de actividad de la enzima es de 4 a 7.

8.2.3.- Condiciones de manejo de los organismos.

El dispositivo experimental constó de 18 tinas de 200 L de capacidad, a una densidad de 15 organismos por tanque, los cuales fueron mantenidos a una salinidad de 36 partes por mil, temperatura de 28±1°C por medio de un enfriador marca Acuabone, y oxigenación a saturación (6.50 ± 0.50 mg/L) monitoreado por medio de un oxímetro de la marca HACH modelo hqd40. Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) fueron monitoreados dos veces al día (7:00 y 19:00 horas). El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

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

8.2.4.- Alimentación.

Los organismos fueron alimentados en 3 raciones diarias (7:00, 13:00 y 19:00 hrs). La ración alimenticia se calculó a razón del 3% de su biomasa y a la cantidad de alimento no consumido.

8.2.5.- Parámetros evaluados.

8.2.5.1- Supervivencia, crecimiento y tasa de crecimiento (SGR).

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

$$\text{Tasa de supervivencia} = (\text{número final/número inicial}) \times 100.$$

- El crecimiento se evaluó comparando los promedios de pesos finales de cada tratamiento.
- La tasa específica de crecimiento (specific growth rate “SGR”) se calculó con la siguiente fórmula:

$$100 (\ln \text{ peso promedio final} - \ln \text{ peso promedio inicial}) / \text{No. días.}$$

8.2.5.2.- Indicadores de la respuesta fisiológica.

8.2.5.2.1.- Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno (O₂) se determinó mediante un respirómetro de sistema abierto, utilizando 7 cámaras respirométricas con capacidad de 500 mL, en las que se colocaron los organismos individualmente, dejando una cámara vacía que sirvió como cámara control. Los organismos que se utilizaron en la respirometría permanecieron en ayuno durante 18 horas para lograr una mejor aclimatación y disminuir el efecto de estrés por manipulación. Después de 18 horas de aclimatación se determinó en las primeras dos horas el consumo de oxígeno en ayuno, por medio de un oxímetro (OXY-10). Posteriormente, se alimentaron los animales con la dieta correspondiente a su tratamiento y se determinó el consumo de oxígeno cada hora, el cual corresponde al consumo de oxígeno post-alimentario.

El consumo de O₂ se determinó por medio de las diferencias en la concentración de O₂ en el agua de entrada y salida de las cámaras, y conociendo la velocidad (constante promedio de 10 ml/min.) y temperatura (28°± 1 C) (Rosas *et; al* 1999)

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

Donde:

VO₂: Consumo de oxígeno expresado en miligramo de oxígeno por hora por animal.

[O₂] entrada: Concentración en mg por litro de oxígeno en el agua que entra a la cámara respirométrica.

[O₂] salida: Concentración en mg por litro de oxígeno en el agua que sale de la cámara respirométrica.

F: Velocidad o flujo en el que pasa el agua a través de la cámara respirométrica expresada en litros por hora.

De acuerdo con Rosas., (2003), la calorimetría permite estimar la energía canalizada en la producción de tejido, por lo que se obtendrán valores en joules por gramo de peso seco por muestra, el cual corresponde a las unidades expresadas de energía retenida (RE) en $J \text{ dia}^{-1} \text{ animal}^{-1}$.

Para el análisis se utilizaron 6 camarones por tratamiento, mismos a los que previamente se les determino el consumo de O_2 . Posteriormente, los camarones fueron sometidos a un proceso de secado durante 24 horas a 60°C , macerado y pulverizado, y se hicieron pastillas de aproximadamente $0.3 \pm .05 \text{ g}$ (3 réplicas por camarón). Se utilizó una bomba calorimétrica de la marca Parr, la cual se introdujo en una cubeta de acero con 2L de agua destilada a una temperatura de 2°C menor a la temperatura ambiente.

La fórmula para determinar el contenido de energía fue la siguiente:

$$Hg = \{(\Delta T^\circ\text{C}W) - (e_1 + e_2) N\} M$$

Donde:

Hg: Energía bruta de la muestra.

$\Delta T^\circ\text{C}$: Diferencia de temperatura entre $T^\circ\text{C}_0$ y $T^\circ\text{C}_x$.

W: Constante para estandarizar.

e_1 : Consumo de NaOH para titular.

e_2 : Diferencia entre alambre inicial y quemado.

N: Calorías estándar del alambre.

M: Peso pastilla.

Los valores de energía excretada (UE+ZE) fueron estimados de acuerdo a la ecuación de Bureau *et al.* (2000) que corresponde al 8% de la sumatoria de la energía retenida (RE).

$$UE+ZE= (RE+HeE+HiE)*0.08$$

Donde:

UE+ZE: Excreciones no fecales.

RE: Energía retenida (crecimiento).

HeE: Energía basal.

HiE: Incremento calórico.

0.08: Constante.

Los valores de energía perdida durante la muda (HxE) representan un 25% de la energía retenida (RE), y se estimaron de acuerdo al método de Bureau *et al.* (2000), donde se utilizó la siguiente fórmula:

$$HxE=0.25*(RE)$$

Donde:

0.25: Constante.

RE: Energía retenida (crecimiento).

La energía perdida en la exuvia (SE) se calculó de la siguiente manera:

$$SE=0.03*(RE+HeE+HiE+HxE)}$$

Donde:

0.03: Constante.

RE: Energía retenida (crecimiento).

HeE: Energía basal.

HiE: Incremento calórico.

HxE: Energía perdida durante la muda.

8.2.5.2.2.- Balance bioenergético.

El modelo del balance energético es un modelo en el que se integran diversas respuestas fisiológicas con el principal fin de conocer los destinos de la energía ingerida, incluyendo tanto los relacionados con el mantenimiento de las funciones básicas, como los dirigidos al mantenimiento de la homeostasis o la producción de biomasa y gametos. El crecimiento de un individuo es determinado por la masa y el balance de energía. Este crecimiento está limitado por la fuente de energía y nutrientes (vitaminas y minerales) los cuales se adquieren a través del alimento, el cual, en la mayoría de los casos es limitado. De esta forma la relación entre energía del alimento y crecimiento estará mediada por la relación entre costo y beneficio: Aquellos individuos que reciban los mayores beneficios después de haber pagado los costos metabólicos necesarios para mantenerse vivos tendrán la mayor masa y energía por unidad de tiempo necesaria para ser llevada a la producción de biomasa corporal y la reproducción (Rosas *et al.*, 2000).

El valor del incremento calórico aparente (HiE) de cada organismo se determinó por la diferencia entre el máximo valor de oxígeno consumido obtenido después de haber sido alimentado y el valor del ayuno, ambos valores serán transformados a J animal⁻¹ mediante el coeficiente 14.3 J mg O₂⁻¹ (Lucas, 1996). Para transformar los valores de ayuno (HeE) a J día⁻¹ animal⁻¹, se multiplicarán por 24 horas, y los de incremento calórico aparente serán multiplicados por tres debido a que los animales se alimentarán tres veces al día.

Para determinar la energía digerible y el balance energético se utilizó la siguiente fórmula:

$$DE= RE + HeE + HiE + HxE + (UE + ZE) + SE$$

Donde:

DE: Energía digestible

RE: Energía retenida (crecimiento)

HeE: Energía basal.

HiE: Incremento calórico.

(UE+ZE): Excreciones no fecales.

HxE: Energía perdida durante la muda

SE: Energía perdida en la exuvia.

8.2.5.3.- Actividad enzimática y concentración de proteína soluble.

Teniendo conocimiento del equipo enzimático, podemos deducir qué ingredientes podrán ser utilizados en la fabricación de alimentos balanceados.

La tripsina y quimotripsina representan más del 60% de la actividad proteasica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos. En conjunto, las enzimas digestivas que poseen los camarones son capaces de hidrolizar una variedad de sustratos y varios factores están implicados en su regulación, entre ellos se encuentran la dieta (Guzmán *et al.* 2001), los cambios ontogenéticos y el ciclo de muda (Fernández *et al.* 1997)

Cadena, (2002) determinó la mayor actividad de proteasas (tripsina y quimotripsina) en los estadios C y D0, coincidiendo con la etapa donde el camarón blanco, *Penaeus vannamei*, consume 18% más alimento.

Por ello, se determinó la actividad enzimática de los organismos mediante extractos de hepatopáncreas de los organismos (*P. vannamei*) en estadios C y D0 sometidos a los diferentes tratamientos. Los estadios de muda fueron determinados mediante la observación del desarrollo setal o setogénesis (Betancourt *et al.*, 1993). Posteriormente los

hepatopáncreas se almacenaron en microtubos Ependorff™ manteniéndose en nitrógeno líquido (-70°C) hasta la evaluación.

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

La concentración de proteína soluble se determinó utilizando el kit Micro Protein Determination (BIO-RAD 500-0006) de Sigma, basados en el método de Bradford (1976). Para la evaluación de tripsina, se utilizó el método propuesto por Geiger y Fritz (1988) empleando BAPNA (benzoyl-arginina-p-nitro-anilida) (Sigma B7632) 100 como sustrato en un amortiguador Tris 0.1 M, pH 8. La tasa de hidrólisis del sustrato se midió como el incremento en la absorbancia en un espectrofotómetro marca SPECTRONIC modelo 21D a 405 nm durante dos minutos, obteniendo la diferencia en absorbancia entre el primer minuto y el segundo utilizando un coeficiente de extinción $\epsilon_{405}=1.021 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Geiger, 1988). Una unidad fue definida como la actividad correspondiente a 1 µM de p-nitro-anilida liberado en un minuto. La actividad de quimotripsina se midió por el mismo método, utilizando SAPPNA (succinil-alanina-2-prolina-fenil-p-nitro-anilida) como sustrato de la reacción (Geiger, 1988).

8.2.6.- Análisis estadísticos.

La prueba estadística utilizada para analizar los resultados de supervivencia, crecimiento, SGR y actividad enzimática fue una ANOVA de una vía.

En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una alfa 0.05. El análisis estadístico se realizó con el paquete Statistical Analysis Software Program of SAS 2006.

8.3.- RESULTADOS.

8.3.1.- Supervivencia, Crecimiento y la tasa de supervivencia (SGR).

El análisis de la supervivencia mediante el ANOVA no indicó diferencias significativas (figura 2 y tabla 5) entre los tratamientos ($p > 0.05$)

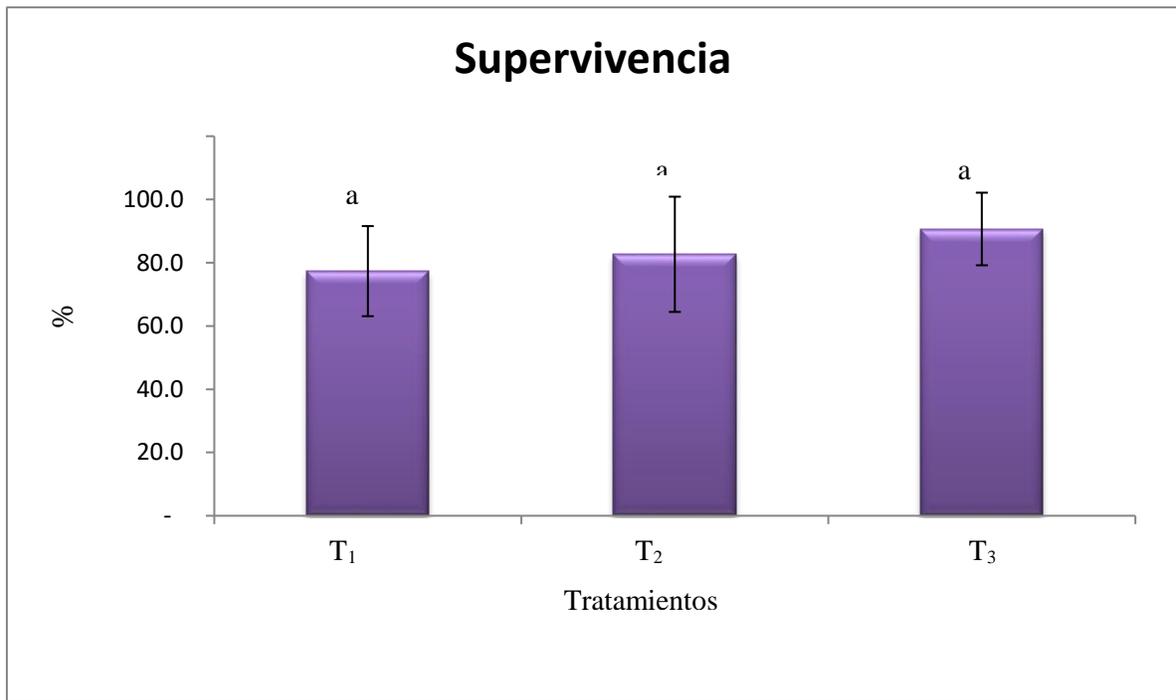


Figura 2. Supervivencia promedio

Tabla 5. Datos de supervivencia. (Promedios ± error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃
Supervivencia (%)	77 ± 14.2 ^a	82.7 ± 18.2 ^a	90.7 ± 11.5 ^a

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

El ANOVA para los pesos finales indicó diferencias significativas (figura 3 y tabla 6) entre el tratamiento T₁ y los tratamientos T₂ y T₃ que obtuvieron los mayores valores de ganancia de peso (P<0.05),

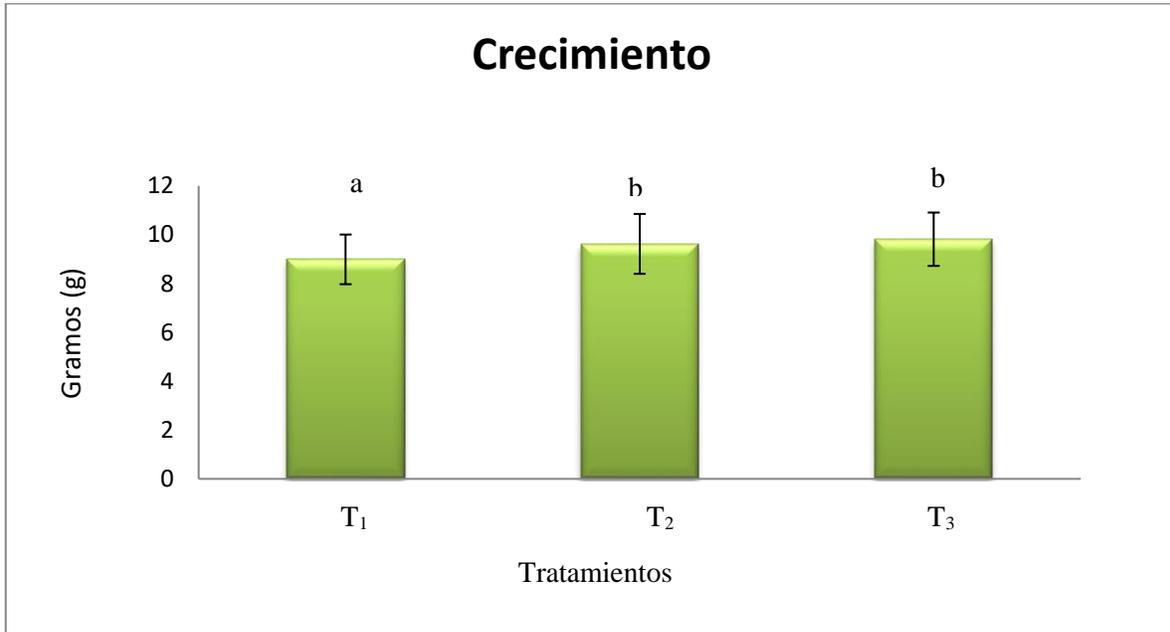


Figura 3. Promedios de crecimiento.

Tabla 6. Datos de crecimiento de juveniles *L. vannamei*. (Promedios ± error estándar).

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
T ₁	7.24 ± 0.59 ^a	8.9 ± 1.0 ^a
T ₂	7.15 ± 0.59 ^a	9.6 ± 1.2 ^b
T ₃	7.24 ± 0.58 ^a	9.8 ± 1.0 ^b

*Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05). *Peso final promedio determinado en 39, 45 y 42 organismos por tratamiento (T₁, T₂ y T₃), respectivamente.

La tasa específica de crecimiento “SGR”, evaluada mediante el ANOVA indicó diferencias significativas entre el tratamiento T₁ (P<0.05), al obtener los menores valores, en

comparación a los obtenidos en los tratamientos T₂ y T₃, que presentó una tendencia hacia los valores más altos, como se muestran en la tabla 7 y figura 4.

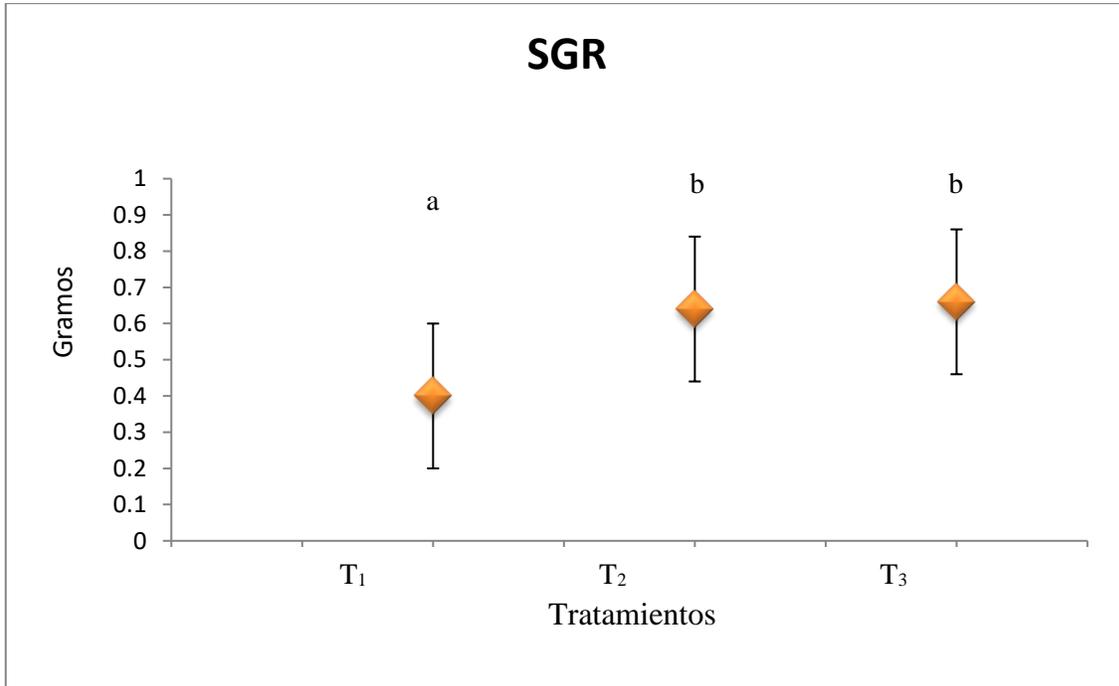


Figura 4. Tasa específica de crecimiento.

Tabla 7. Datos de SGR. (Promedios ± error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃
SGR	0.4 ± 0.2 ^a	0.64 ± 0.2 ^b	0.66 ± 0.2 ^b

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

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

La tabla 8 muestra los valores promedios obtenidos para la concentración de proteína soluble en los tratamientos (T₁, T₂ y T₃), los valores se muestran en mg/g de tejido de glándula

digestiva (mg/g GD). Los cuales no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) al ser analizados estadísticamente.

Tabla 2. Promedios de concentración de la proteína soluble \pm error estándar.

	T ₁	T ₂	T ₃
Proteína soluble	2.12 \pm 0.6 ^a	1.64 \pm 0.4 ^a	2.24 \pm 0.7 ^a

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

En lo que respecta a la actividad específica de la tripsina proveniente del hepatopáncreas de los juveniles de *P. vannamei*, el ANOVA indicó que hubo un efecto significativo por acción de la dieta, ($p<0.05$). La actividad significativamente más baja se presentó en el T₂. Los valores promedios obtenidos de actividad de tripsina se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Promedios de actividad de la tripsina \pm error estándar.

	T ₁	T ₂	T ₃
Tripsina	6.98 \pm 0.7 ^a	5.42 \pm 0.2 ^b	6.91 \pm 0.7 ^a

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

El análisis de la actividad específica de la quimotripsina mediante el ANOVA no indicó diferencias significativas (tabla 10) entre los tratamientos ($p>0.05$)

Tabla 10. Promedios de actividad de la quimotripsina \pm error estándar.

	T ₁	T ₂	T ₃
Quimotripsina	16.69 \pm 1.8 ^a	24.62 \pm 1.8 ^b	16.53 \pm 2.0 ^a

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

8.3.3.- Balance bioenergético

Los valores de HeE evaluados mediante la ANOVA, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Pero, por otro lado, se manifestaron diferencias ($p < 0.05$) entre los valores de HiE, teniendo el nivel más bajo en el T₃ en comparación de los T₂ y del T₁, como se muestra en la tabla 11.

Así mismo, los valores de la energía retenida (RE) comparados mediante la ANOVA, determinó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el T₁ y los T₂ y T₃, los cuales presentaron los mayores valores.

Tabla 11. Promedios de HeE, HiE y RE.

	T ₁	T ₂	T ₃
HeE	2308.8 ± 438.61 ^a	442.73 ± 109.02 ^a	648.99 ± 26.50 ^a
HiE	2441.1 ± 71.37 ^a	355.51 ± 56.65 ^a	1002.52 ± 32.38 ^b
RE	2683.9 ± 461.99 ^a	175.66 ± 30.24 ^b	1095 ± 104.53 ^b

*Los valores se presentan en J día⁻¹ animal⁻¹. Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). *Promedios determinados en seis replicas por tratamiento.

En la figura 5 y tabla 12 se representa los porcentajes de distribución de energía en los organismos alimentados con los tratamientos (T₁, T₂ y T₃).

Tabla 12. Resultados de Balance bioenergético.

	DE	HeE	Hie	ZE +UE	RE	SE	Hxe
T ₁	100	58.6	11.2	6.9	16.5	2.7	4.1
T ₂	100	54.8	8.0	6.8	22.5	2.2	5.6
T ₃	100	57.7	3.8	6.8	23.6	2.3	5.9

*Valores expresados en porcentaje (%). DE: Energía digestible, HeE: Energía basal, Hie: Incremento calórico, RE: Energía retenida, (ZE + UE): Excreciones no fecales, Hxe: Energía perdida durante la muda, SE: Energía perdida en la exuvia.

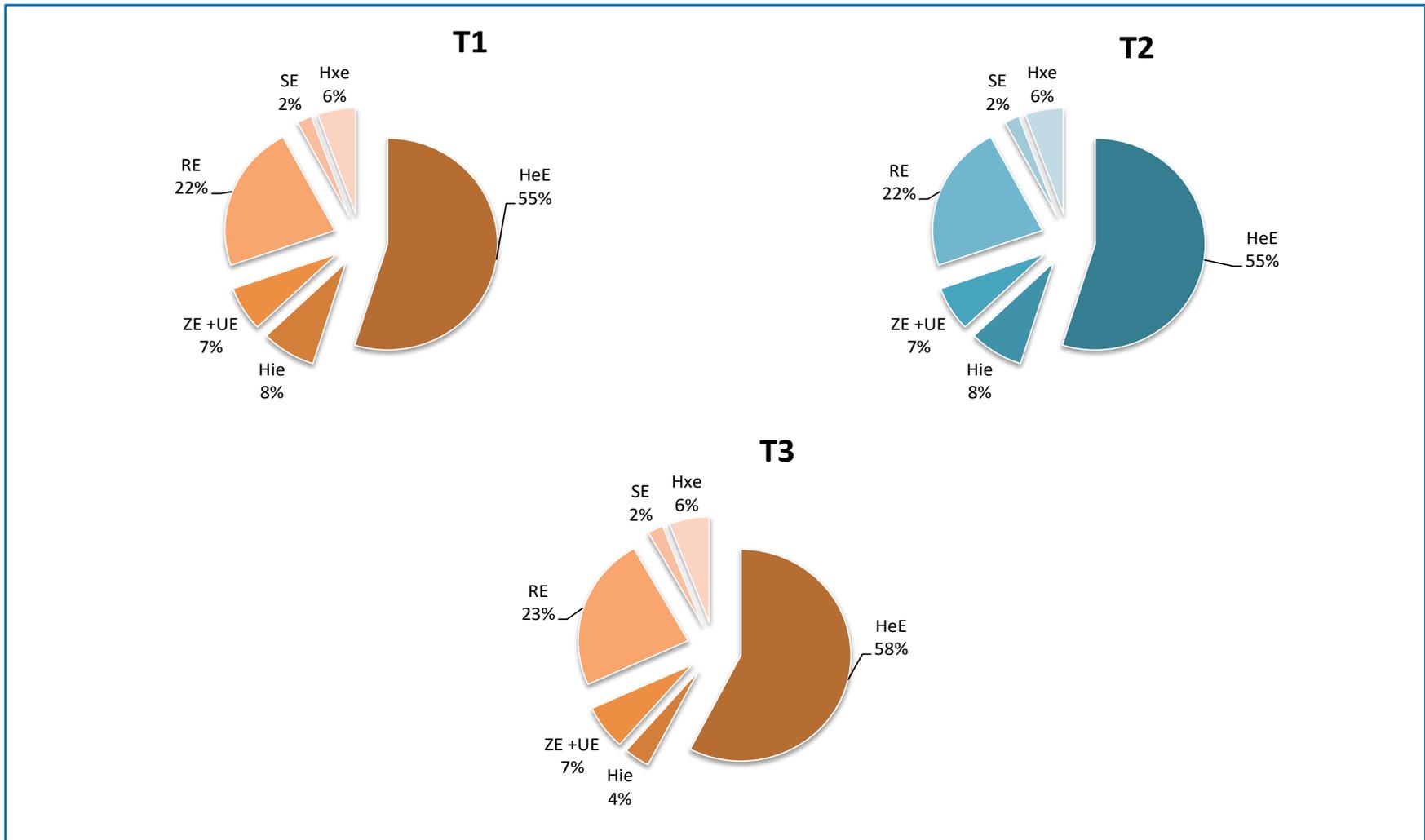


Figura 5. Índice del reparto bioenergético en juveniles de *P. vannamei*.

8.4.- DISCUSIÓN

Una breve reseña de ingredientes vegetales se presenta en las tablas (1, 2 y 3), y es un indicativo de la variedad de fuentes evaluadas con y sin la inclusión de fitasa (6000-3000FTU g-1) en la alimentación de diferentes especies de camarones peneidos, en un intento de promover el incremento de la ganancia de peso de los camarones alimentados con dietas libres de harina de pescado (Suarez *et al.*, 2009; Moreno-Arias *et al.*, 2016; Barreto-Altamirano *et al.*, 2020). Los ingredientes de origen vegetal permiten mantener la ganancia de peso en los cortos periodos que han sido evaluados (Chaudhuri, Choudhury, 1994, Wasielevsky *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2006; Cruz-Suarez *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). El efecto en los camarones alimentados a base de fuentes vegetales es analizado por medio de los porcentajes de supervivencia y ganancia de peso. Biswas *et al.* (2007) reportan índices de supervivencia inferiores a 80% en *Penaeus monodon* alimentados con dietas a base de harina de soya y con inclusión de fitasa, aunque en este caso el resultado obtenido fue atribuido al método de cultivo y no por la fitasa exógena utilizada. El fitato presente en dietas vegetales reduce los niveles de Zn^{+12} y P^{+3} en el hepatopáncreas de *P. vannamei* (Davies & Lawrence, 1993), mientras que en *P. monodon* puede observarse un aumento en el tamaño de las células B hepatopancreáticas (Kumaraguru *et al.*, 2007).

Civera y Guillaume (1989) reportaron que el ácido fítico no ejerció un efecto de mortalidad cuando el fitato de sodio se utilizó como fuente de P^{+3} para juveniles de *Penaeus japonicus* y *P. vannamei*. Los juveniles de *P. vannamei* alimentados con los tratamientos (T₂ y T₃) presentaron un mayor porcentaje de supervivencia (la mejor supervivencia del 90% se obtuvo en el T₃ (fitasa FTE II) comparados con el grupo control (T₁).

El fitato presente en las dietas vegetales es degradado en el tracto gastrointestinal de organismos monogástricos (Afinah *et al.* 2010). Sin embargo, los camarones no pueden digerirlo debido a que carece de la enzima fitasa (Biswas *et al.*, 2007), por lo que su crecimiento se ve afectado. En *P. vannamei* alimentados con la adición de fósforo fítico en el alimento, se demostró que el crecimiento de estos animales era menor (Civera & Guillaume, 1989). No obstante, con la adición de fitasas exógenas el crecimiento puede ser

mayor, gracias a que la actividad proteolítica de las enzimas digestivas es mayor cuando la fitasa está presente (Divakaran & Ostrowski, 1998).

Resultados similares fueron reportados por Biswas *et al.*, (2007), quienes encontraron que al alimentar a *P. monodon* con dietas con inclusión de lisina-fitasa, el índice de crecimiento era mayor que cuando se adicionaba solo fitasa. Es posible que exista un efecto sinérgico entre la lisina (Lys) y la fitasa, ya que en el presente trabajo de investigación se incluyó un 0.9% de este aminoácido, valor similar al utilizado en el estudio de Biswas *et al.*, (2007), donde esta fue utilizada a un porcentaje de inclusión de 1% Lys.

Davis *et al.*, (2000) reportaron un incremento en el crecimiento y supervivencia de *P. vannamei* alimentados con la inclusión de fitasa exógena en la dieta. A su vez, Ricque-Marie *et al.*, (2004) obtuvieron un incremento en la digestibilidad de proteína y hasta un 180% de digestibilidad de P⁺³ en dietas elaboradas a base de harina de chícharo suplementadas con fitasa. Utilizando dietas con harina de soya pre-tratada con una fitasa recombinante C (1000 y 2000 FTU) también se mostró un mayor crecimiento en la misma especie de camarón (Cheng *et al.*, 2012). Por lo tanto, se puede concluir que el contenido dietético de fósforo fítico en dietas elaboradas con fuentes de proteína vegetal reduce el crecimiento de los camarones, por lo que la adición de fitasas exógenas disminuye el efecto de factores antinutricionales, tal y como se ha observado en especies monogástricas (aves y cerdos), las cuales presentan mayores tasas de crecimiento y supervivencia, debido a que la fitasa favorece la digestibilidad de fósforo fítico (Pontoppidan *et al.*, 2007).

En el presente estudio, la concentración de proteína soluble no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, lo cual coincide con Rivas (2006), quien no obtuvo diferencias al utilizar dietas con diferentes harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*) en *P. vannamei*, donde la mayor asimilación de P⁺³ se obtuvo en las harinas de frijol cocido y germinado (85-90%) con respecto a la menor (57%), por lo que la cantidad de fósforo asimilado parece no incidir en la cantidad de proteína soluble presente en el hepatopáncreas de esta especie.

La actividad específica de tripsina del T₃ no presentó un efecto significativo, en comparación al tratamiento control (T₁), resultado similar reportado por Rivas (2006). Sin embargo, T₂ presentó menor actividad en comparación con T₁, resultado contrario reportado por Divakaran *et al.*, (1998), quienes reportan un incremento lineal de tripsina con relación a las unidades de fitasa (EC 3.1.3.26, SIGMA©) utilizadas. En el caso de quimotripsina, se obtuvo un efecto positivo en T₂ con respecto a T₁ y T₃. Esto puede deberse a que la fitasa utilizada en T₂ (Ronozyme P5000 CT) es un producto enzimático producido industrialmente para degradar el fitato de origen natural y liberar el P⁺³ para el crecimiento en cerdos (Nielsen & Wenzel, 2006), siendo su rango de actividad a pH de 4 a 7, mientras que el pH fisiológico de *P. vannamei* es de 7 a 8 (Guerrero *et al.*, 2008).

Esta diferencia de pH y la temperatura utilizada en el proceso de preparación de las dietas pudo provocar que la fitasa Ronozyme P5000 CT actuara de manera sub-óptima y estuviera expuesta al ataque proteolítico de la quimotripsina presente en *P. vannamei*, ya que la fitasa exógena requiere poseer resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas, estabilidad a las temperaturas en el procesado de los alimentos y una baja lixiviación (Guerrero *et al.*, 2008), de igual manera las fitasas bacterianas (FTEII) parecen tener una mayor resistencia a la degradación proteolítica que las fúngicas (Ronozyme P5000 CT) (Igbasan *et al.*, 2000).

En cuanto al balance bioenergético, la cantidad de energía requerida por un organismo para su mantenimiento es directamente proporcional a su tamaño o cantidad de biomasa. Esto se verifica con los valores HeE obtenidos en este estudio, donde el tratamiento T₁ mostró un menor requerimiento de energía porque los camarones eran de menor talla, a diferencia del T₃, donde los camarones eran más grandes; por lo tanto, HeE de este último fue superior a los valores en los tratamientos T₁ y T₂.

El HiE reveló que la ausencia de la enzima fitasa y los altos niveles de fitato en T₁ provocaron un mayor requerimiento de energía para metabolizar los nutrientes, en comparación con T₂ y T₃ que requirieron menor energía, debido a la presencia de fitasa. Sin embargo, el tratamiento T₂ mostró mayor costo energético en el proceso de metabolismo, debido a que la

fitasa incluida está diseñada para trabajar a pH ácido (animales monogástricos) y no alcalino (camarón). En el primer caso, la enzima fitasa fue adicionada directamente y fue fácilmente degradada por las enzimas digestivas, en contraste con la acción de la fitasa del tercer tratamiento. El T₃ fue más eficiente en cuanto a asimilación y almacenamiento de energía obtenida a través de la dieta, caso contrario al T₁ donde la RE fue inferior, esto debido a la ausencia de fitasa. Estos resultados se correlacionaron con los valores obtenidos en la SGR (Tabla 7), la cual también fue inferior en T₁. La aplicación de fitasa en dietas preparadas a partir de ingredientes de origen vegetal puede ser una alternativa para mejorar la utilización del fósforo fítico, disminuir la incorporación de fósforo inorgánico en la formulación de la dieta, aumentar el crecimiento del camarón y reducir la eutrofización del medio ambiente.

8.5.- CONCLUSIONES

- El método de pretratamiento de las pastas de soya y canola con FTEII y la inclusión directa de fitasa Ronozyme en la dieta no repercutió de manera negativa en la supervivencia de los juveniles de *P. vannamei*.
- La inclusión de fitasa (Ronozyme y FTEII) favoreció la tasa de crecimiento (SGR) y el crecimiento en camarones juveniles de *P. vannamei*.
- La inclusión directa de Ronozyme y el pretratamiento con FTE II en las harinas vegetales (soya y canola) no afectó la concentración de proteína soluble presente en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*. No obstante, la incorporación de la fitasa Ronozyme afectó la actividad específica de la tripsina y quimotripsina de los juveniles de *P. vannamei*.
- El balance bioenergético reflejó un efecto positivo para el pretratamiento de las harinas vegetales con fitasa FTEII, indicando un menor incremento de calor aparente (HiE).
- La inclusión de fitasa por el método de pretratamiento con FTE y/ o la inclusión directa de Ronozyme en dietas a base de harinas de soya y canola, facilitó la biodisponibilidad de fósforo y proteínas que forman complejos con el fitato, representando así una dieta viable para el cultivo de juveniles de *P. vannamei*.

CAPÍTULO 2

BIOENSAYO 2

**EFECTO DE LA FITASA EN JUVENILES DE *P. vannamei*
ALIMENTADOS CON DIETAS VEGETALES (SOYA Y CANOLA)
LIBRES DE FÓSFORO INORGÁNICO (PREMIX-DSM).**

**IX.- EFECTO DE LA FITASA EN JUVENILES DE *P. vannamei* ALIMENTADOS
CON DIETAS VEGETALES (SOYA Y CANOLA) LIBRES DE FÓSFORO
INORGÁNICO (PREMIX-DSM).**

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar si el ácido fítico que contienen las harinas vegetales puede ser fuente de fósforo en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*. Se evaluaron tres tratamientos: T₁ (Control; libre de fitasa), T₂ (dieta basada en harinas vegetales con fitasa Ronozyme P5000 CT) y T₃ (dieta con fitasa FTEII). Los resultados indicaron que el peso promedio final de los organismos en los tres tratamientos fue similar ($p > 0.05$), y no hubo una diferencia significativa en la supervivencia entre los tratamientos. Los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína ($CDA_{Proteína}$) y de fósforo ($CDA_{Fósforo}$) no se mejoraron significativamente en las dietas que contenían la inclusión de fitasa ($p > 0.05$). De igual manera, los análisis de calidad del músculo y concentración de fósforo circulante en la hemolinfa no reflejaron un efecto positivo por la presencia de fitasa en las dietas ($p > 0.05$). En conjunto, los resultados demuestran que las concentraciones de 2500 U Ronozyme (T₂) o 1600 U de fitasa FTE II (T₃) no sustituyen la inclusión de fósforo de la premezcla de minerales en las dietas a base pasta de soya y canola de juveniles de *P. vannamei*.

9.1.1.- INTRODUCCIÓN.

La industria acuícola ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años, alcanzando un máximo histórico de producción con 90.4 millones de toneladas en el 2012 (FAO., 2014). La misma tendencia se ha reflejado en la demanda de la harina de pescado, la cual se reconoce como el insumo más utilizado como fuente de proteína (Muñoz et al., 2015) por contar con un buen perfil de aminoácidos esenciales (Suarez et al., 2000), así como su alta digestibilidad de materia seca, energía y nitrógeno (Zhoug et al., 2004), y que en conjunto con fuentes de carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, como el fósforo, constituye la base en la preparación de alimentos acuícolas (Hung *et al.*, 2015).

No obstante, uno de los obstáculos para el desarrollo de la acuicultura es el impacto que ésta tiene en el medio ambiente por las descargas de agua con altos contenidos de elementos como el nitrógeno (N), y el fósforo (P) (Moyoroqui *et al.*, 2012; Sun., 2012; Zhang *et al.*, 2015), que son importantes en la nutrición de los organismos al formar parte en la mineralización, ácidos nucleicos y reacciones celulares (Ambasankar *et al.*, 2006), pero que provocan eutrofización en el ambiente (Herath y Satoh, 2015).

El requerimiento de P en los cultivos de camarón es normalmente sustituido por el P presente en los ingredientes del alimento o por la adición de mezclas de minerales (Ambasankar *et al.*, 2007; Pretha *et al.*, 2012). Sin embargo, el exceso de P a causa un mal manejo en la fertilización, alimentación (Baccarin *et al.*, 2005), formulación y subutilización por los organismos es liberado al ambiente a través de los efluentes, causando problemas de eutrofización e impactos negativos a la biodiversidad local (Moyoroqui *et al.*, 2012; Herath y Satoh, 2015; Vass *et al.*, 2015).

Por otra parte, debido al aumento en los costos y el desabasto de la harina de pescado de alta calidad, en conjunto con la necesidad de reducir las excreciones de nitrógeno y fósforo, últimamente se han utilizado ingredientes derivados de fuentes vegetales para sustituir la harina de pescado como fuente de proteína en la dietas (Velma *et al.*, 2000; Pretha., 2012). Sin embargo, es necesario considerar que más del 80% del fósforo total contenido en las

fuentes vegetales se encuentra en forma de fitato, el cual no está biodisponible para organismos monogástricos o agástricos que carecen de enzima fitasa, necesaria para su hidrólisis (Sotelo *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2015).

Sin duda el valor potencial de la fitasa en dietas con proteína vegetal, estriba en permitir que la fitasa reemplace la suplementación de fósforo (P) inorgánico a través de la utilización del fósforo fítico, con lo cual se puedan reducir los costos de producción y los niveles de fósforo excretado por los animales (hasta en un 50%), disminuyendolos efectos negativos al ambiente (Phillippy, 1999), al mismo tiempo que se satisfacen los requerimientos de fósforo para los animales en estudio, toda vez que es un componente básico de los ácidos nucleicos y ATP (Rebollar & Mateos., 1999), esencial para el crecimiento, el mantenimiento de la homeostasis mineral y de la mayoría de las reacciones metabólicas (Cabrera *et al.*, 2002).

El presente estudio se desarrolló para examinar la respuesta de juveniles de *P. vannamei* ante una dieta sin inclusión de fósforo proveniente de la premezcla de minerales, y evaluar si la hidrólisis del ácido fítico por medio de la inclusión de fitasa exógena libera la cantidad de fósforo requerido para mantener la homeostasis de camarón.

9.1.2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿El ácido fítico que contienen las harinas vegetales puede ser fuente de fósforo en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*?

9.1.3.- HIPÓTESIS.

Si el ácido fítico que contienen las harinas vegetales no puede ser fuente de fósforo en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*, entonces las dietas sin inclusión de fósforo inorgánico (PREMIX-DSM) afectarán los parámetros zootécnicos de juveniles de *P. vannamei*.

9.1.4.- OBJETIVO.

Evaluar si el ácido fítico que contienen las harinas vegetales puede ser fuente de fósforo en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*.

9.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

9.2.1.- Diseño experimental.

El diseño fue completamente aleatorizado con 3 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento, donde se usaron juveniles ($1.7 \pm 0.2\text{g}$) de *Penaeus vannamei* obtenidos de estanques de cultivo exteriores de la UMDI, Sisal, Yucatán, México. Los cuales fueron mantenidos durante 60 días (10 aclimatación y 50 periodo experimental) en un sistema de recirculación, en condiciones controladas de cultivo, (tanques de 400 L, a una densidad de 65 camarones por tanque) y alimentados con tres tratamientos: dieta vegetal con fitasa Ronozyme P5000 CT (T2), dieta vegetal con fitasa FTEII (T3), las cuales fueron comparadas contra una dieta control elaborada con fuentes de proteína vegetal sin inclusión de fitasa (T1).

9.2.2.- Composición de las dietas.

Las dietas experimentales (tabla 13) se prepararon en el Laboratorio de Nutrición de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal, UNAM), siguiendo el protocolo de elaboración de una dieta artificial para camarón, que consistió en una molienda y tamizado de materias primas que fueron llevadas al mismo tamaño de partícula (250 micras) para poder ser homogenizadas en la mezcladora y después añadirle los aceites y el aglutinante, permitiendo que se mezclaran hasta formar la pasta que fue peletizada para poder secarse a 60°C durante 12 horas.

Las harinas (canola y soya) del T₃ fueron pretratadas con una enzima fitasa FTEII, la cual es una forma recombinante producida por *Pichia pastoris* (1080 U/mL, actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 9, y actividad máxima en un intervalo de temperatura de 25°C a 80°C), producida en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Viader *et al.*, 2010).

Tabla 13. Formulación de dietas para el bioensayo.

Materias Primas	T ₁ g/100g	T ₂ g/100g	T ₃ g/100g
Harina de pescado	5	5	5
Concentrado proteico de soya ¹	27	27	27
Pasta de soya	22	22	22
Pasta de canola	22	22	22
L-lisina	0.9	0.9	0.9
DL- metionina	0.7	0.7	0.7
Aceite de Pescado ³	8	8	8
Colesterol	0.1	0.1	0.1
Almidón de trigo	9.3	9.3	9.3
Premezcla de vitaminas y minerales ²	2.5	2.5	2.5
Carboximetil celulosa	1	1	1
Zeolita ⁴	1.45	1.45	1.45
Ronozyme ⁵	0	0.05	0
Relleno	0.05	0	0.05
Total	100	100	100

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

Así mismo, siguiendo el protocolo descrito por Nwana *et al.*, (2007), ambas harinas (220 g de soya y 220 g de canola) se incubaron durante 15.5 horas a 50°C en una relación 1:1.5 (harina: agua), con la inclusión de 1.6 U de fitasa (FTEII) por gramo de harina vegetal tratada. Para posteriormente secarlas por 12.5 horas a 60°C, con la finalidad de eliminar la humedad y permitir su fácil homogenización con el resto de los ingredientes hasta formar una pasta que también fue peletizada, como en el caso de los tratamientos T₁ y T₂.

Por otro lado, la fitasa granular Ronozyme P5000 CT fue incluida en la dieta (T₂) junto con los ingredientes secos. En la cual se incluyó 0.5g de fitasa (2500 U) por kilogramo de alimento. La fitasa granular RonozymeTMP5000 CT, es una enzima fitasa derivada de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae*. El rango de actividad de la enzima es en pH de 4 a 7.

9.2.3.- Condiciones de manejo de los organismos.

El dispositivo experimental constó de 9 tinas de 400 L de capacidad, a una densidad de 65 organismos por tanque, los cuales fueron mantenidos a una salinidad de 36 partes por mil, temperatura de 28±1°C por medio de un enfriador marca Acuabone, y oxigenación a saturación (6.50 ± 0.50 mg/L) monitoreado por medio de un oxímetro de la marca HACH modelo hqd40. Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) fueron monitoreados dos veces al día (7:00 y 19:00h). El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La calidad del agua se mantuvo por medio de diferentes filtros: un filtro de arena de lecho profundo, filtro UV, filtros de cartucho 50 y 20 µm y un espumador.

9.2.4.- Alimentación.

El periodo de aclimatación de los organismos al sistema y a las dietas experimentales fue de 10 días previos al inicio del experimento de digestibilidad. Posteriormente, los animales

fueron alimentados 6 veces al día con las dietas experimentales y la colecta de las heces se realizó después de cada alimentación.

9.2.5.-Técnica de recolección de heces.

Se asignaron cinco horarios de alimentación para el experimento en curso: 08:00, 09:00, 10:00, 11:00 y 12:00 h. Transcurrida una hora posterior a cada alimentación, se procedió a retirar las heces con ayuda de un sifón, el cual conectó a un papel filtro colocado en un embudo, lo que facilitó la eliminación del exceso de agua y la retención de las heces en el filtro. Una vez terminada la recolección de heces, se procedió a retirar de igual manera el alimento no consumido para proceder a alimentar en el siguiente horario asignado. Los filtros con heces de cada tratamiento fueron refrigerados a 4°C hasta la siguiente colecta. En la recolección final del día, las heces se lavaron con agua destilada y se procedió al secado en una estufa con una temperatura constante de 60°C. La última alimentación fue dada a las 18:00 horas de cada día, sin embargo, no se colectaron las heces en este horario. La cantidad de heces recolectadas al final del periodo experimental fue de alrededor de 2 g/tanque (peso seco).

9.2.6.- Parámetros a evaluar.

9.2.6.1- Supervivencia y crecimiento.

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

$$\text{Tasa de supervivencia} = (\text{número final} / \text{número inicial}) \times 100.$$

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

9.2.6.2.- Determinación de la Digestibilidad Aparente.

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

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

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

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

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

9.2.6.3.- Determinación de los niveles de fósforo en la hemolinfa.

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

$$\text{Concentración} = \frac{((\text{DO muestra.prom} - \text{DO blanco}) - a)}{b} * \text{factor de dilución}$$

9.2.6.4.- Determinación de textura.

El análisis de firmeza se determinó en el laboratorio de Instrumentación Analítica, Instituto Tecnológico de Mérida, utilizando una prensa INSTRON serie 4400, usando un punzón cilíndrico de 33 mm de diámetro, con punta plana, con una velocidad de avance de 25 mm/min permitiendo una penetración de 3 mm. El resultado se expresó como kilogramos/fuerza.

9.2.7.- Análisis estadísticos.

La prueba estadística utilizada para analizar los resultados de supervivencia, crecimiento, actividad enzimática, textura y fósforo en hemolinfa fue una ANOVA de una vía. Los coeficientes de digestibilidad fueron transformados en Arcoseno radial, y se les aplicó un análisis de varianza de una vía para determinar la posible existencia de diferencias significativas entre los tratamientos.

En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una probabilidad de (alfa) 0.05. El análisis estadístico se realizó con el paquete Statistical Analysis Software Program of SAS 2006.

9.3.- RESULTADOS

9.3.1.- Supervivencia y Crecimiento.

El análisis de la supervivencia mediante el ANOVA no indicó diferencias significativas (figura 6 y tabla 14) entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 14. Datos de supervivencia. (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃
Supervivencia (%)	53 \pm 17.2 ^a	53 \pm 6.1 ^a	54 \pm 4.4 ^a

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

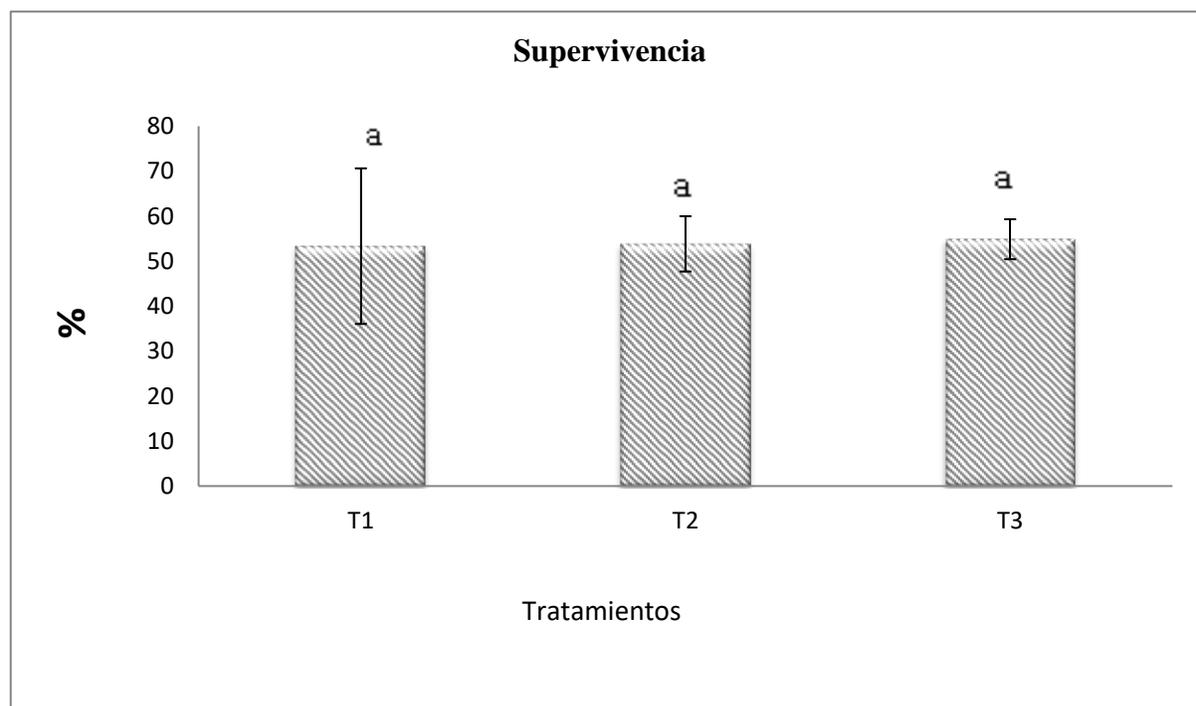


Figura 6. Supervivencia promedio.

El crecimiento evaluado mediante el ANOVA no indicó diferencias significativas (figura 7 y tabla 15) entre los tratamientos ($p > 0.05$).

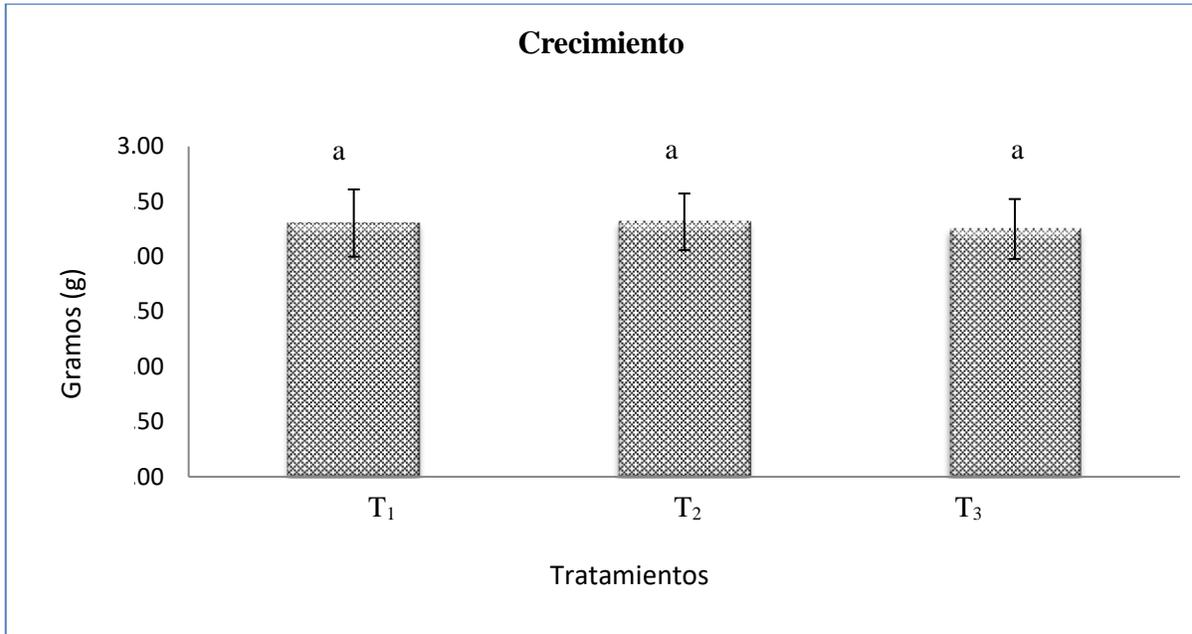


Figura 7. Promedio de crecimiento.

Tabla 15. Datos de crecimiento. (Promedios \pm error estándar).

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
T ₁	1.7 \pm 0.2 ^a	2.3 \pm 0.3 ^a
T ₂	1.7 \pm 0.2 ^a	2.3 \pm 0.2 ^a
T ₃	1.7 \pm 0.2 ^a	2.2 \pm 0.2 ^a

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

9.3.2.- Coeficientes de digestibilidad aparente.

En la figura 8 se muestra la concentración de fósforo de las heces y del alimento de cada tratamiento, y en la tabla 16 se presentan los resultados de los CDA.

El ANOVA para el $CDA_{Materia}$ no indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$). De igual manera, en los $CDA_{Proteína}$ no se reflejó un efecto relacionado a la inclusión de fitasa ($p>0.05$). No obstante, el análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p<0.05$) en el $CDA_{Fósforo}$ del tratamiento control y los experimentales.

Tabla 16. Coeficientes de digestibilidad aparente “CDA”. (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃
$CDA_{Materia}$	83.2 ± 4.9^a	72.9 ± 9.5^a	77.8 ± 13.6^a
$CDA_{Fósforo}$	71.8 ± 4.2^a	59 ± 1.67^b	57.1 ± 5.7^b
$CDA_{Proteína}$	40.5 ± 4.1^a	39.8 ± 2.5^a	45.2 ± 2.6^a

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

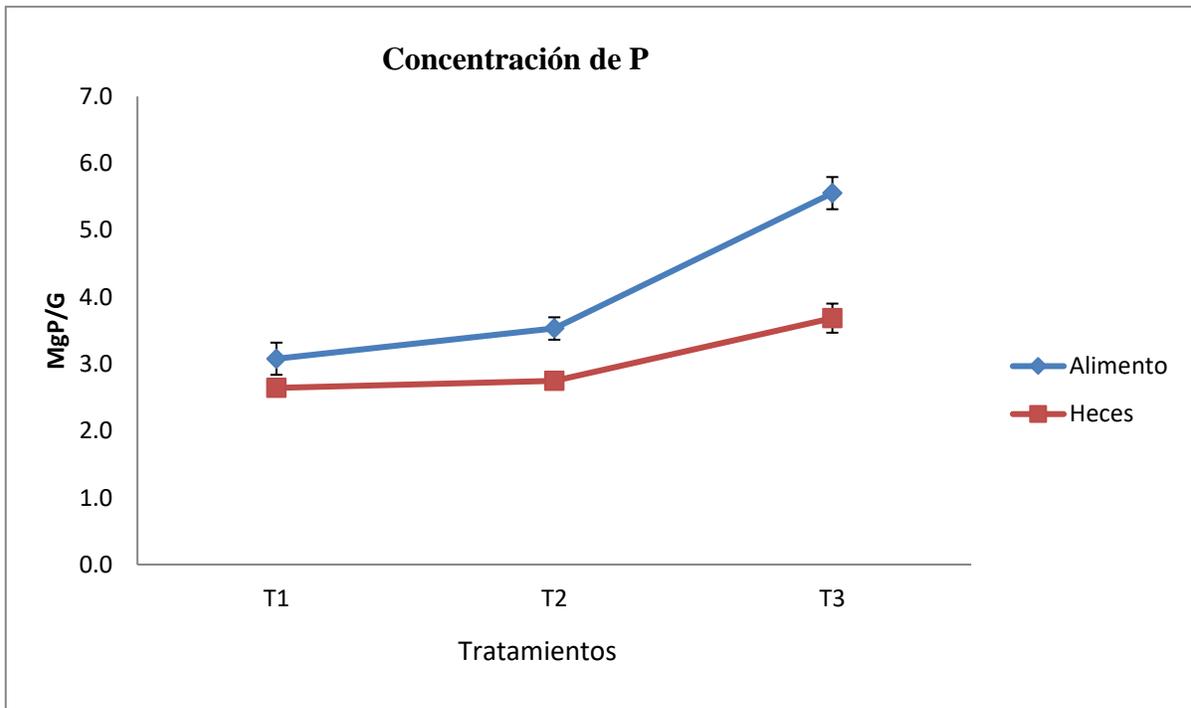


Figura 8. Promedio de fósforo en heces y alimento.

9.3.3.- Textura y concentración de fósforo en hemolinfa.

El ANOVA para el análisis de textura (resistencia a la penetración), no indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$), ver tabla 17.

Tabla 17. Análisis de textura. (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃
Textura Kg/Fuerza	.55 \pm 0.2 ^a	.54 \pm 0.2 ^a	.54 \pm 0.1 ^a

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

Así mismo, la concentración de fósforo circulante (concentración de fósforo en la hemolinfa) mediante el ANOVA no indicó diferencias significativas (tabla 18) entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 18. Análisis de fósforo en hemolinfa. (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃
mg P/L plasma	39.5 \pm 11.3 ^a	39.2 \pm 13.4 ^a	33.5 \pm 10.5 ^a

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

9.4.- DISCUSIÓN.

La presente investigación ha demostrado que la inclusión de la fitasa exógena, en sus dos presentaciones (Ronozyme y FTEII) y concentraciones evaluadas (2500 y 1600 FTU, respectivamente), no mejoró la calidad de las dietas libres de fósforo inorgánico en las que se mezcló la pasta de soya y la pasta de canola para la alimentación de los juveniles del camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Lo cual, se vio reflejado en la calidad del músculo (.55 Kg/fuerza), no presentando diferencias significativas entre los tratamientos y siendo inferiores a los reportados por Li *et al.*, (2011) en camarones frescos de *P. vannamei* (1.09 kg/fuerza). Navarro (2014) indicó que la dureza o resistencia al corte es el atributo de textura más crítico en productos marinos, la cual depende del tejido conectivo, compuesto principalmente de colágeno, el cual le da la fuerza tensora y de miofibrillas compuestas de actina y miosina. No obstante, la menor tasa de supervivencia (39%) de las réplicas se obtuvo en el tratamiento control (T₁) en comparación con las dietas de prueba. Los juveniles del tratamiento control, alimentados con dietas sin ninguna fuente de fósforo (premezcla de minerales y lecitina) no pudieron sobrevivir, observando los eventos de mayor mortalidad durante los periodos de muda. En contraste, los organismos de los tratamientos T2 y T3 tuvieron una supervivencia ligeramente mayor (53%). Si bien las diferencias en supervivencia entre los tratamientos no fueron significativas, la tendencia puede indicar que el fósforo bajo la forma de fitato pudo ser liberado y utilizado por los camarones en una forma limitada, pero mayor que la obtenida en el tratamiento control. Aún así, se constata que los índices de supervivencia y ganancia de peso semanal (0.25 g) obtenidos en el presente estudio están por debajo de los reportados por Foster & Dominy., (2002) para juveniles de *P. vannamei* en condiciones controladas (1 g / semana).

Por otra parte, los resultados pudieran indicar algún tipo de evidencia sobre el síndrome de muerte por muda o MDS por sus siglas en inglés (molt death síndrome), como lo descrito en *Homarus* (Gallagher *et al.*, 1979), y que pudo haber sido experimentalmente reproducido en *P. vannamei*. Lo cual, puede ser de interés para la formulación de los alimentos por dos razones, la primera relacionada al uso de las formas solubles de fosfatos ya descritas y que no siempre se aplican a nivel productivo, y la segunda sobre la tendencia del contenido de la

mezcla de minerales que fue diseñada en relación al requerimiento nutricional de peneidos como *P. japonicus* (Deshimaru, 1971). Esto se refuerza con la tendencia al desarrollo de alimentos a base de fuentes vegetales para camarones peneidos, y que la presencia de enzimas exógenas no pueden resolver completamente el problema. En ocasiones, la falta de conocimiento sobre los tipos de fosfatos, el contenido de ceniza y el aumento de los ingredientes vegetales (harina de soya, canola, lupino, salvado de trigo, etc.), por consiguiente el incremento del contenido de fósforo, es de preocupación no solo para el cultivo tradicional en estanques de tierra, sino también en jaulas flotantes en aguas oligotróficas (Aquacop, 2012).

En peces y en menor medida en camarones, el requerimiento de fósforo pudiera ser satisfecho por la acción de las enzimas exógenas sobre las fuentes vegetales. Sin embargo, las temperaturas alcanzadas durante el proceso de elaboración de los alimentos pudieran tener un efecto negativo y reducir su actividad. Anteriormente, la disponibilidad de fósforo fue descrita en *P. japonicus* (Cuzon *et al.*, 1980) y llevó a prever un efecto de la lactosa, que puede reducir el pH a nivel intestinal permitiendo solubilizar en una forma más eficiente el fosfato (CaHPO_4). Porterioemnete (Civera y Guillaume, 1985), ayudaron a entender la fisiología digestiva de los camarones y la pobre utilización de estos fosfato debido a un pH neutro en el tracto digestivo del camarón.

Los resultados inconsistentes que se han publicado sobre el uso de fitasa incrementan la necesidad de evaluar datos sobre su efecto en la digestibilidad de fósforo, y poder contrastar con los resultados obtenidos por Guillame *et al.*, (1983) en camarones peneidos alimentados con salvado de trigo rico en fitato (> 60%).

En relación al MDS los valores de fosfatemia obtenidos en una etapa de muda pudieran ser un indicador de la condición mineral en los organismos. Anteriormente (resultados no publicados) se evaluó y observó en el estadio de intermuda variaciones significativas ante diferentes dietas que contenían fosfatos solubles o fósforo dicalcico y con los valores reportados en camarones silvestres de *L. stylirostris* (Shimidzu *et al.*, 2011) con 30 mg L^{-1} en comparación de 104 mg L^{-1} respectivamente. Los ensayos realizados en jaulas flotantes

no permiten detectar un pico de mortalidad durante el periodo de muda y una alta densidad en el cultivo ($> 500 / m^2$) no permiten relacionar la mortalidad con el pico de muda. Por otra parte, en estas condiciones aumenta la tendencia al canibalismo y la re-ingestión de exoesqueletos, no permitiendo establecer una relación entre el déficit de P-PO₄ y MDS.

Previamente se ha descrito que la actividad fitasa se veía disminuida por el efecto de la temperatura (60 ° C) durante la peletización del alimento, pero hoy en día una protección de la enzima la permite trabajar incluso con el proceso de extrusión. Diversos tipos de fitasa han sido desarrolladas y se ha demostrado su eficacia en piensos de cerdos y aves (Acosta *et al.*, 2006; Vallardi *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2009) en contraste de su aplicación en la acuicultura, y aunado al problema de lixiviación en el medio, hace que la información sea limitada.

El presente estudio mostro que el CDA_{Fósforo} presentó un efecto positivo ante las formas solubles de fosfatos. Sin embargo, en los resultados no se consideró la excreción endógena de fósforo. No obstante, la ganancia de peso promedio, supervivencia y fosfatemia son una manera de confirmar un efecto por presencia o una ausencia de la efectividad de las fitasas.

Algunas fuentes de fosfatos han sido estudiadas (Civera *et al.*, 1999) y se ha determinado una mejor ganancia de peso de *P.japonicus* con NaH₂PO₄ comparado con CaHPO₄. Sin embargo, los organismos de *P.vannamei* no respondieron de igual forma. *P. japonicus* mostró una digestibilidad del fitato de sodio en relación con una acción de la fosfatasa alcalina en el hepatopáncreas. Por el contrario, *P. vannamei* no pudo hidrolizar el fitato mostrando una baja en el CDA_{Fósforo} (<40%). Así mismo, los CDA de proteína de las dietas experimentales con fitasa no presentaron un efecto positivo, e incluso fueron inferiores a lo reportado por McCallum *et al.*, (2000) para *Penaeus stylirostris* (91.3%) y Suárez *et al.*, (2008) para *P. vannamei* (91%) alimentados con canola.

En resumen, establecer la disponibilidad de fósforo es un tema complejo si se consideran las especies de cultivo, el grado de efectividad de la fitasa exógena, la composición de los alimentos, niveles de inclusión de fuentes vegetales, la forma de fósforo adicionada en la premezcla de minerales y la fisiología de los organismos, por ejemplo, las sales de fosfatos

en pH básico pudieran disociarse de una manera más eficiente. Fernández *et al.*, (1983) indicaron que una cantidad adecuada de minerales en los alimentos puede reflejar un impacto positivo en el espesor del exoesqueleto, y en consecuencia una disminución del MDS.

El requerimiento de minerales de los camarones es probablemente subestimado en los alimentos comerciales y en ocasiones en las dietas experimentales, y no se cuenta con una medida precisa sobre la pérdida de minerales por efecto de la muda. Siendo difícil establecer el grado de significancia, pues en el caso del Ca, el déficit es compensado por la absorción directa desde el agua. El fósforo no puede ser absorbido de manera directa. Esto, pudiera derivar en que la relación Ca/P en los alimentos no es precisamente un indicador de los requerimientos nutricionales, mientras que la fosfatemia pudiera ser un buen indicador del estatus nutricional (Sugiura *et al.*, 2000) debido a su poca variación durante el ciclo de muda (Vijayan A. & D. Diwan D., 2002), la cual pudiera ser utilizado como parámetro indicador en los cultivos en jaulas oligotróficas (Aquacop, 2.011-12).

9.5.- CONCLUSIONES.

- El método de pretratamiento de las pastas de soya y canola con FTEII o la inclusión directa de la fitasa Ronozyme en dietas libres de fósforo inorgánico (PREMIX-DSM) no afectó de manera positiva los índices de supervivencia de los juveniles de *P. vannamei*.
- La inclusión de fitasa (Ronozyme y FTEII) no favoreció el crecimiento en camarones juveniles de *P. vannamei* alimentados con dietas libres de P inorgánico (PREMIX)
- Los coeficientes de digestibilidad aparente de fósforo ($CDA_{Fósforo}$) y proteína ($CDA_{Proteína}$) no mostraron un efecto positivo ante la inclusión de fitasa.
- El fósforo producto de la hidrólisis del fitato en las harinas vegetales no sustituye la incorporación del fósforo inorgánico en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*.

CAPÍTULO 3

BIOENSAYO 3

**SUSTITUCIÓN PARCIAL DE HARINA DE PESCADO POR FUENTES
VEGETALES (SOYA Y CANOLA) E INCLUSIÓN DE FITASA Y
MINERALES (CaHPO₄) EN DIETAS DE JUVENILES DE *P. vannamei*.**

X.- SUSTITUCIÓN PARCIAL DE HARINA DE PESCADO POR FUENTES VEGETALES (SOYA Y CANOLA) E INCLUSIÓN DE FITASA Y MINERALES (CaHPO₄) EN DIETAS DE JUVENILES DE *P. vannamei*.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar si la inclusión de fitasa en dietas vegetales (pastas de soya y canola) enriquecidas con fósforo inorgánico e incorporación de betaina, es un método que permite superar las limitaciones relacionadas al uso de fuentes de proteínas vegetal como una alternativa a la sustitución parcial o total de la harina de pescado en dietas para juveniles de *P. vannamei*. Se evaluaron seis tratamientos: T₁ (Control; con 25% harina de pescado), T₂ (dieta con 20% harina de pescado), T₃ (con 15% harina de pescado), T₄ (con 10% de harina de pescado), T₅ (con 5% de harina de pescado) y T₆ (alimento comercial). Los resultados indicaron que los pesos promedios finales, el conteo total de hemocitos (CTH) y la presión osmótica (mOsm) fueron similares en los seis tratamientos ($p > 0.05$). En contraste, los índices de supervivencia y biomasa del T₄ y T₆ presentaron los mayores valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$). En cuanto a la actividad de SOD se presentaron diferencias entre los tratamientos, donde el valor más bajo se obtuvo en el T₂. Por otra parte, no se observaron diferencias ($p > 0.05$) en la concentración de proteínas solubles proveniente del hepatopáncreas de los camarones sometidos a las diferentes dietas, al igual que la actividad específica de la tripsina y quimotripsina. En el balance bioenergético los valores de energía basal (HeE) y de incremento de calor aparente (HiE) fueron similares en los seis tratamientos ($p > 0.05$). En el caso de la energía retenida (RE), el T₄ presentó los mayores valores entre los diferentes tratamientos evaluados ($p < 0.05$). Por último, la calidad del músculo de los camarones no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) ante los diferentes niveles de sustitución de la harina de pescado en sus dietas. Los resultados demuestran que una correcta formulación que permita cubrir los requerimientos de fósforo (Premix y CaHPO₄), aumente la atractabilidad (betaina) y disminuya los efectos negativos

del ácido fítico, (fitasa) es clave para que los juveniles de *P. vannamei* puedan aprovechar de una manera eficiente los nutrientes de las fuentes de proteína vegetal.

10.1.1.- INTRODUCCIÓN.

El requerimiento de fósforo en los camarones se definió anteriormente (Davis *et al.*, 1999) y se describieron algunos aspectos relacionados con el uso de lactosa en *P. japonicus* (Cuzon *et al.*, 1980) al igual que el desbalance nutricional relacionado con el desequilibrio en la relación Ca /P en *Homarus* (Callagher *et al.*, 1979). Todas esas investigaciones se llevaron a cabo en condiciones de agua clara y usando dietas purificadas o prácticas. Sin embargo, la formulación de los piensos para el camarón fueron modificados drásticamente por la disminución de la harina de pescado en el mercado y el aumento en los costos de producción.

El uso de proteínas de origen vegetal como la soya, el trigo, la canola, el maíz y el lupino se han estudiado en la nutrición de organismos acuícolas como una alternativa al reemplazo parcial o total de la harina de pescado (Tacon y Foster, 2000; Hardy, 2008; Maldonado *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2009). Sin embargo, las limitaciones en el uso de las fuentes de proteínas vegetal están relacionadas a la disminución de la ingesta de alimento por el animal a causa de la falta de atractabilidad y la presencia de factores antinutricionales (ANF) como el ácido fítico (AF). El ácido fítico reduce la biodisponibilidad de ciertos minerales causando un impacto negativo en la nutrición de los organismos (Lee y Meyers, 1996; Mendoza *et al.*, 2000; Mendoza, 2003). El ácido fítico es una forma libre de inositol hexafosfato, clasificado como una molécula de poli-anicónica con seis grupos fosfatos que pueden quelar fuertemente cationes como el Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} y K^{+} , formando sales insolubles (Kumar *et al.*, 2011) y alterando la absorción y digestión de estos minerales (Papatryphon *et al.*, 1999).

La excreción de PO_4 es otra de las consecuencias causadas por una baja digestibilidad de las fuentes vegetales con alto contenido de AF para los organismos acuáticos. La hidrólisis del AF mediante la inclusión de fitasas exógenas es una estrategia que permite la optimización de los valores nutricionales de las fuentes de proteína vegetal (Fox *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011). Por lo tanto, la inclusión de fitasa en alimentos acuícolas es una opción para eliminar o reducir el efecto negativo de AF, mejorando de esa manera la actividad de las enzimas proteolíticas, las tasas de supervivencia y la ganancia de peso (Lim y Lee, 2009).

El presente estudio se realizó para evaluar si la inclusión de fitasa en dietas vegetales (pastas de soya y canola) enriquecidas con fósforo inorgánico (Premix y CaHPO_4) e incorporación de betaína, como attractante, es un método que permite superar las limitaciones relacionadas al uso de fuentes de proteínas vegetal como una alternativa a la sustitución parcial o total de la harina de pescado.

10.1.2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿El efecto antinutricional del ácido fítico, la falta de atractabilidad y el desbalance Ca:P son los limitantes para la sustitución parcial y/o total de la harina de pescado por harinas vegetales (soya y canola) en dietas de juveniles de *P. vannamei*?

10.1.3.- HIPÓTESIS.

Si el efecto antinutricional del ácido fítico, la falta de atractabilidad y el desbalance Ca:P son los limitantes para la sustitución parcial y/o total de la harina de pescado por harinas vegetales (soya y canola) en dietas de juveniles de *P. vannamei*, entonces la inclusión de fitasa, betaína y fosfato dicalcico en dietas de juveniles de *P. vannamei* permitirán la sustitución parcial y/o total de la harina de la harina de pescado, y se promoverá un efecto positivo en los parámetros zootécnicos de juveniles de *P. vannamei*.

10.1.4.- OBJETIVO.

El objetivo del presente estudio fue evaluar si la inclusión de fitasa en dietas vegetales (pastas de soya y canola) enriquecidas con fósforo inorgánico (Premix y CaHPO_4) e incorporación de betaína como attractante, es un método que permite superar las limitaciones relacionadas al uso de fuentes de proteínas vegetal como una alternativa a la sustitución parcial o total de la harina de pescado.

10.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

10.2.1. Dispositivo experimental

El diseño para el experimento fue completamente aleatorizado con 6 tratamientos y 6 réplicas por tratamiento, donde se usaron juveniles (2.56 ± 0.31) de *Penaeus vannamei*, los cuales se obtuvieron de la granja Acuicultura 2000 ubicada en China, Campeche, México, y fueron mantenidos durante 70 días (10 aclimatación y 60 periodo experimental) en un sistema de recirculación, en condiciones controladas de cultivo (tanques de 150 L, a una densidad de 20 camarones por tanque), y alimentados con seis tratamientos (ver tabla 3): dieta control con 25% harina de pescado (T₁), dieta con 20% harina de pescado (T₂), dieta con 15% harina de pescado (T₃), dieta 10% de harina de pescado (T₄), dieta 5% de harina de pescado (T₅), y una dieta comercial (T₆).

10.2.2.- Composición de las dietas

Las dietas experimentales (ver tabla 19) se prepararon en el Laboratorio de Nutrición de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal, UNAM), siguiendo el protocolo de elaboración de una dieta artificial para camarón, que consistió en una molienda y tamizado de materias primas que fueron llevadas al mismo tamaño de partícula (250 micras) para poder ser homogenizadas en la mezcladora y después añadirle los aceites y el aglutinante, permitiendo que se mezclaran hasta formar la pasta que fue peletizada y secada a 60°C durante 12 horas.

La fitasa granular Ronozyme P5000 CT se adicionó en las dietas (T₁ –T₅) junto con los ingredientes secos. En la cual se incluyó 0.5g de fitasa (2500 U) por kilogramo de alimento. La fitasa granular RonozymeTMP5000 CT, es una enzima fitasa derivada de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae*. El rango de actividad de la enzima es a pH de 4 a 7.

Tabla 39. Formulación de dietas para el bioensayo.

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Harina de Pescado	25	20	15	10	5	
Pasta de canola	8	11	11	14	22	
Pasta de soya	12	16	17	19	25	
Concentrado proteico de soya (PROFINE) ¹	1	3	5	8	8	
Harina de trigo	43.02	34.92	33.92	29.42	14.92	
Aceite de pescado ²	2	3	5	4	6	
Lecitina de soya	2	2	2	2	2	
Lisina	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	Api-camarón
DL-Metionina	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	
Colesterol	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
Taurina	-	1	1	1	2	
Betaina	-	0.5	1	1.5	2	
Premezcla de vitaminas y minerales ³	1	1.6	2.1	2.3	2.9	
Stay-C	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	
CaHPO ₄	2.2	3.2	3.2	5	6.4	
CMC	2	2	2	2	2	
Fitasa Ronozyme ⁴	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
Total	100	100	100	100	100	

*Los niveles de inclusión se expresan en gramos por cada 100 gramos (g/100g). ¹Profine E, Central Soya Inc., 70.40% de proteína. ²Aceite de hígado de bacalao CEDROSA, ³Rovimix® Roche. ⁴DSM Ronozyme P5000 CT (5000 U/g).

10.2.3.- Condiciones de manejo de los organismos

El dispositivo experimental constó de 36 tinas de 150 L de capacidad, a una densidad de 20 organismos por tanque, los cuales fueron mantenidos a una salinidad de 36 partes por mil, temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por medio de un enfriador marca Acuabone, y oxigenación a saturación (6.50 ± 0.50 mg/L) monitoreado por medio de un oxímetro de la marca HACH modelo hqd40. Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) fueron medidos dos veces al día (7:00 y 19:00h). El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La calidad del agua se mantuvo por medio de diferentes filtros: filtro de arena de lecho profundo, filtro UV, cartuchos seriados de 50 y 20 μm , y un espumador. El agua se mantuvo en un sistema de recirculación..

10.2.4.- Alimentación

Los organismos fueron alimentados en 3 raciones diarias (7:00, 13:00 y 19:00 hrs). La ración alimenticia se calculó a razón del 3% de su biomasa y a la cantidad de alimento no consumido.

10.2.5.- Parámetros evaluados

10.2.5.1- Supervivencia, crecimiento y SGR

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

$$\text{Tasa de supervivencia} = (\text{número final/número inicial}) \times 100.$$

- El crecimiento se evaluó comparando los promedios de pesos finales de cada tratamiento.
- La biomasa se determinó comparando la sumatoria de los pesos finales de cada tratamiento.
- La tasa específica de crecimiento (specific growth rate “SGR”) se calculó con la siguiente fórmula:

$$100 (\ln \text{ peso promedio final} - \ln \text{ peso promedio inicial}) / \# \text{días.}$$

10.2.5.2- Tasa de conversión alimenticia y tasa de eficiencia proteínica.

Los promedios de tasa de conversión alimenticia (TCA) y la tasa de eficiencia proteínica (TEP) fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{TCA} = \text{alimento consumido (g)} / \text{ganancia de peso (g)}.$$

$$\text{TEP} = \text{ganancia de peso (g)} / \text{proteína consumida (g)}.$$

10.2.5.3.-Determinación de textura (resistencia al corte)

El análisis de textura se determinó en doce músculos de camarones (segundo segmento abdominal) por tratamiento en estadio de intermuda. La medición de textura se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, Inmunología y Biología Molecular de la UMDI-SISAI, utilizando una prensa (Brookfield Texturómetro CT3) con una cuchilla de corte 1 mm en forma de guillotina, y con una velocidad de avance de 25 mm/min permitiendo una penetración de 3 mm. El resultado se expresa en milijoules (mJ).

10.2.5.4.- Indicadores de la respuesta fisiológica

10.2.5.4.1.- Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno (O₂) se determinó mediante un respirómetro de sistema abierto, utilizando 8 cámaras respirométricas con capacidad de 450 mL, en las que se colocaron los camarones individualmente, dejando una cámara vacía que sirvió como cámara control. Los organismos que se utilizaron en la respirometría permanecieron en ayuno durante 24 horas para lograr una mejor aclimatación y disminuir el efecto de estrés por manipulación. Después de 24 horas de aclimatación se determinó en las primeras dos horas el consumo de oxígeno de ayuno, por medio de un oxímetro (OXY-10). Posteriormente, se alimentaron los animales con la dieta correspondiente a su tratamiento y se determinó el consumo de oxígeno a cada hora, el cual corresponde al consumo de oxígeno post-alimentario.

El consumo de O₂ se determinó por medio de las diferencias en la concentración de O₂ en el agua de entrada y salida de las cámaras, y conociendo la velocidad (constante promedio de 5 ml/ segundo) y temperatura (28°± 1 C) (Rosas *et al.*,1999)

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

Donde VO₂ es el consumo de oxígeno expresado en miligramo de oxígeno por hora animal; [O₂] entrada, es la concentración en mg por litro de oxígeno en el agua que entra a la cámara respirométrica; [O₂] salida, es la concentración en mg por litro de oxígeno en el agua que sale de la cámara respirométrica; F es la velocidad o flujo en el que pasa el agua a través de la cámara respirométrica expresada en litros por hora.

De acuerdo con Rosas., (2003), la calorimetría permite estimar la energía canalizada en la producción de tejido, por lo que se obtendrán valores en joules por gramo de peso seco por muestra, el cual corresponde a las unidades expresadas de energía retenida (RE) en $J \text{ dia}^{-1} \text{ animal}^{-1}$.

Para el análisis se utilizaron 7 camarones por tratamiento, mismos a los que previamente se les determinó el consumo de O_2 . Posteriormente, los camarones fueron sometidos a un proceso de secado durante 24 horas a $60^\circ C$, macerado y pulverizado, y se hicieron pastillas de aproximadamente $0.3 \pm .05 \text{ g}$ (3 réplicas por camarón). Se utilizó una bomba calorimétrica de la marca Parr, la cual se introdujo en una cubeta de acero con 2L de agua destilada a una temperatura de $2^\circ C$ menos que la temperatura ambiente.

La fórmula para determinar el contenido de energía fue la siguiente:

$$Hg = \{(\Delta T^\circ C W) - (e1 + e2) N\} M$$

Donde:

Hg: Energía bruta de la muestra.

$\Delta T^\circ C$: Diferencia de temperatura entre $T^\circ C_0$ y $T^\circ C_x$.

W: Constante para estandarizar.

e1: Consumo de NaOH para titular.

e2: Diferencia entre alambre inicial y quemado.

N: Calorías estándar del alambre.

M: Peso pastilla.

Los valores de energía excretada (UE+ZE) fueron estimados de acuerdo a la ecuación de Bureau *et al.* (2000) que corresponde al 8% de la sumatoria de la energía retenida (RE).

$$UE + ZE = (RE + HeE + HiE) * 0.08$$

Donde:

UE+ZE: Excreciones no fecales.

RE: Energía retenida (crecimiento).

HeE: Energía basal.

HiE: Incremento calórico.

0.08: Constante.

Los valores de energía perdida durante la muda (HxE) representan un 25% de la energía retenida (RE), y se estimaron de acuerdo al método de Bureau *et al.* (2000), donde se utilizó la siguiente fórmula:

$$HxE=0.25*(RE)$$

Donde:

0.25: Constante.

RE: Energía retenida (crecimiento).

La energía perdida en la exuvia (SE) se calculó de la siguiente manera:

$$SE=0.03*(RE+HeE+HiE+HxE)}$$

Donde:

0.03: Constante.

RE: Energía retenida (crecimiento).

HeE: Energía basal.

HiE: Incremento calórico.

HxE: Energía perdida durante la muda.

10.2.5.4.2.- Balance bioenergético.

El modelo del balance energético es un modelo en el que se integran diversas respuestas fisiológicas con el principal fin de conocer los destinos de la energía ingerida, incluyendo tanto los relacionados con el mantenimiento de las funciones básicas, como los dirigidos al mantenimiento de la homeostasis o la producción de biomasa y gametos.

El crecimiento está limitado por la fuente de energía y nutrientes (vitaminas y minerales) los cuales se adquieren a través del alimento, el cual, en la mayoría de los casos es limitado. De esta forma la relación entre energía del alimento y crecimiento estará mediada por la relación entre costo y beneficio: Aquellos individuos que reciban los mayores beneficios después de haber pagado los costos metabólicos necesarios para mantenerse vivos tendrán la mayor masa y energía por unidad de tiempo necesaria para ser llevada a la producción de biomasa corporal y la reproducción (Rosas *et al.*, 2000).

El valor del incremento calórico aparente (HiE) de cada organismo se determinó por la diferencia entre el máximo valor de oxígeno consumido obtenido después de haber sido alimentado y el valor del ayuno, ambos valores se transformaron a $J \text{ animal}^{-1}$ mediante el coeficiente $14.3 J \text{ mg O}_2^{-1}$ (Lucas, 1996). Para transformar los valores de ayuno (HeE) a $J \text{ día}^{-1} \text{ animal}^{-1}$, se multiplicaron por 24 horas, y los de incremento calórico aparente se multiplicaron por tres debido a que los animales se alimentarán tres veces al día.

Para determinar la energía digerible y el balance energético se utilizó la siguiente fórmula:

$$DE = RE + HeE + HiE + HxE + (UE + ZE) + SE$$

Donde:

DE: Energía digestible

RE: Energía retenida (crecimiento)

HeE: Energía basal.

HiE: Incremento calórico.

(UE+ZE): Excreciones no fecales.

HxE: Energía perdida durante la muda

SE: Energía perdida en la exuvia.

10.2.5.5.- Actividad enzimática y concentración de proteína soluble.

Teniendo conocimiento del equipo enzimático, podemos deducir qué ingredientes podrán ser utilizados en la fabricación de alimentos balanceados.

La tripsina y quimotripsina representan más del 60% de la actividad proteásica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos. En conjunto, las enzimas digestivas que poseen los camarones son capaces de hidrolizar una variedad de sustratos y varios factores están implicados en su regulación, entre ellos se encuentran la dieta (Guzmán *et al.* 2001), los cambios ontogenéticos y el ciclo de muda (Fernández *et al.* 1997)

Cadena, (2002) determinó la mayor actividad de proteasas (tripsina y quimotripsina) en los estadios C y D0, coincidiendo con la etapa donde el camarón blanco, *Penaeus vannamei*, consume 18% más alimento.

Por ello, se determinó la actividad enzimática de los organismos mediante extractos del hepatopáncreas de los organismos (*P. vannamei*) en estadios C y D0 sometidos a los diferentes tratamientos (12 extractos por tratamiento). Los estadios de muda fueron determinados mediante la observación del desarrollo setal o setogénesis (Betancourt *et al.*, 1993). Posteriormente los hepatopáncreas se almacenaron en microtubos Ependorff™ manteniéndose en nitrógeno líquido (-70°C) hasta la evaluación.

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

La concentración de proteína soluble se determinó utilizando el kit Micro Protein Determination (BIO-RAD 500-0006) de Sigma, basados en el método de Bradford (1976). Para la evaluación de tripsina, se utilizó el método propuesto por Geiger y Fritz (1988) empleando BAPNA (benzoil-arginina-p-nitro-anilida) (Sigma B7632) como sustrato en un amortiguador Tris 0.1 M, pH 8. La tasa de hidrólisis del sustrato se determinó como el incremento en la absorbancia en un espectrofotómetro marca SPECTRONIC modelo 21D a 405 nm durante dos minutos, obteniendo la diferencia en absorbancia entre el primer minuto y el segundo utilizando un coeficiente de extinción $\epsilon_{405}=1.021 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Geiger, 1988). Una unidad fue definida como la actividad correspondiente a 1 μ M de p-nitro-anilida liberado en un minuto. La actividad de quimotripsina se midió por el mismo método, utilizando SAPPNA (succinil-alanina-2-prolina-fenil-p-nitro-anilida) como sustrato de la reacción (Geiger, 1988).

10.2.5.6.- Parámetros biológicos de la hemolinfa.

Se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos en la hemolinfa de los organismos tratados y controles, siendo estos parámetros los siguientes: conteo total de hemocitos (CTH) y presión osmótica (mOsm).

La hemolinfa de 120 camarones (20 organismos por tratamiento) en estadios C y D0 (200 μ l) fue obtenida por medio de la punción del primer segmento abdominal con la ayuda de una

jeringa (1 ml) y utilizando como anticoagulante una solución isotónica para camarón SIC-EDTA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM y EDTA 20 mM, Ph 7.3) a 8°C, empleando proporciones iguales de anticoagulante y hemolinfa (Perez., 2005; Rosas *et al.*, 2012). Posteriormente, fue separado un volumen de 25 µl de hemolinfa para el conteo de hemocitos totales y el remanente se centrifugo por 10 minutos a 800 g y 4°C, para obtener el plasma para posteriores análisis.

10.2.5.6.1.- Conteo total de hemocitos (CTH).

El conteo total de hemocitos (CTH) fue determinado en 40 µL de hemolinfa de cada organismo. El CTH se realizó utilizando un hemocitómetro o un contador automático de células TC10 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

10.2.5.6.2.- Presión Osmótica (mOsm).

La presión osmótica se determinó en 20 µL de hemolinfa, la cual se analizó en un micro-osmómetro “3 MO-PLUS: Advanced Instruments, Inc. USA” (Rosas *et al.*, 2012). El resultado se expresa en mOsm/Kg.

10.2.5.7.- Determinación de superóxido dismutasa (SOD) .

La SOD se determinó en 10 organismos por tratamiento (60 camarones) en estadio C y D0. Para ello, la extracción de la SOD se realizó por rompimiento celular, donde se colocaron 100 mg de músculo de camarón congelado en un homogenizador mecánico conteniendo 0.5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.8). El homogenizado obtenido fue centrifugado a 5724g por 5 min a 4°C, y el sobrenadante recuperado fue calentado en baño María durante 5 min a 65°C. Se obtuvo un nuevo sobrenadante centrifugando por

segunda ocasión el extracto crudo y se almacenó a -20°C . Las muestras fueron mantenidas en hielo durante todo el proceso de extracción.

La actividad de SOD se determinó mediante la tasa de inhibición del porcentaje de reacción de la enzima con el sustrato colorante de tetrazolio y la xantina oxidasa utilizando un kit de ensayo de SOD (Sigma, 19160), y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro marca SPECTRONIC modelo 21D a 450 nm después de 20 min de tiempo de reacción a 37°C . El porcentaje de inhibición se normalizó por mg de proteína y se representa como unidades de actividad SOD.

10.2.5.8.- Calidad del alimento

10.2.5.8.1.- Análisis químico proximal

Los alimentos fueron analizados en el Laboratorio de Nutrición del CINVESTAV de acuerdo a los métodos de la A.O.A.C. (1995). En donde, se determinó por triplicado: humedad (estufa a 60°C durante 24 horas o hasta peso constante), proteína cruda (micro Kjeldahl), extracto etéreo (Soxhlet), fibra cruda (hidrólisis sucesiva ácido-base) y ceniza (mufla a 550°C durante 24 horas).

10.2.5.8.2.- Determinación de estabilidad en el agua (Hidroestabilidad).

La estabilidad de los alimentos en el agua se determinó siguiendo el protocolo de Ricque-Marie *et al.*, (2006) en Cruz-Suarez *et al.*, (2006) con algunas modificaciones. Los alimentos se pesaron en una balanza (1.0 g de cada alimento experimental por triplicado), y fueron inmersos por 1 hora en agua marina (36 ppm) con temperatura (28°C) y agitación constante

(100 r.p.m). Posteriormente, se retiró el exceso de agua de los tamices (#40), el alimento residual se secó en una estufa con flujo de aire a 60°C por 48 horas o peso constante.

La fórmula utilizada para determinar el porcentaje de materia seca retenida (MSR) o hidroestabilidad, es la siguiente:

$$\text{Materia Seca Retenida (\%)} = \frac{\text{Peso seco del alimento residual}}{\text{Peso seco del alimento inicial}} \times 100$$

10.2.5.8.3.- Análisis de dureza del alimento

La dureza del alimento se determinó utilizando una prensa (Brookfield Texturómetro CT3) equipada con punzón cilíndrico de 60 mm de diámetro, y comprimiendo un pelet individual (6 réplicas por tratamiento) hasta una compresión del 75% de su espesor original, a una velocidad de avance de 25 mm/segundo (Cruz-Suarez *et al.*, 2006). El resultado se expresa en milijoules (mJ).

10.2.6.- Análisis estadísticos

La prueba estadística que se aplicará para analizar los resultados de los parámetros evaluados fue un ANOVA de una vía.

En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una alfa 0.05. El análisis estadístico se realizó con el paquete Statistical Analysis Software Program of SAS 2006.

10.3.- RESULTADOS.

10.3.1.- Supervivencia, Crecimiento y SGR

En análisis de varianza para la supervivencia indicó diferencias significativas (figura 9 y tabla 20) entre los tratamientos ($P < 0.05$).

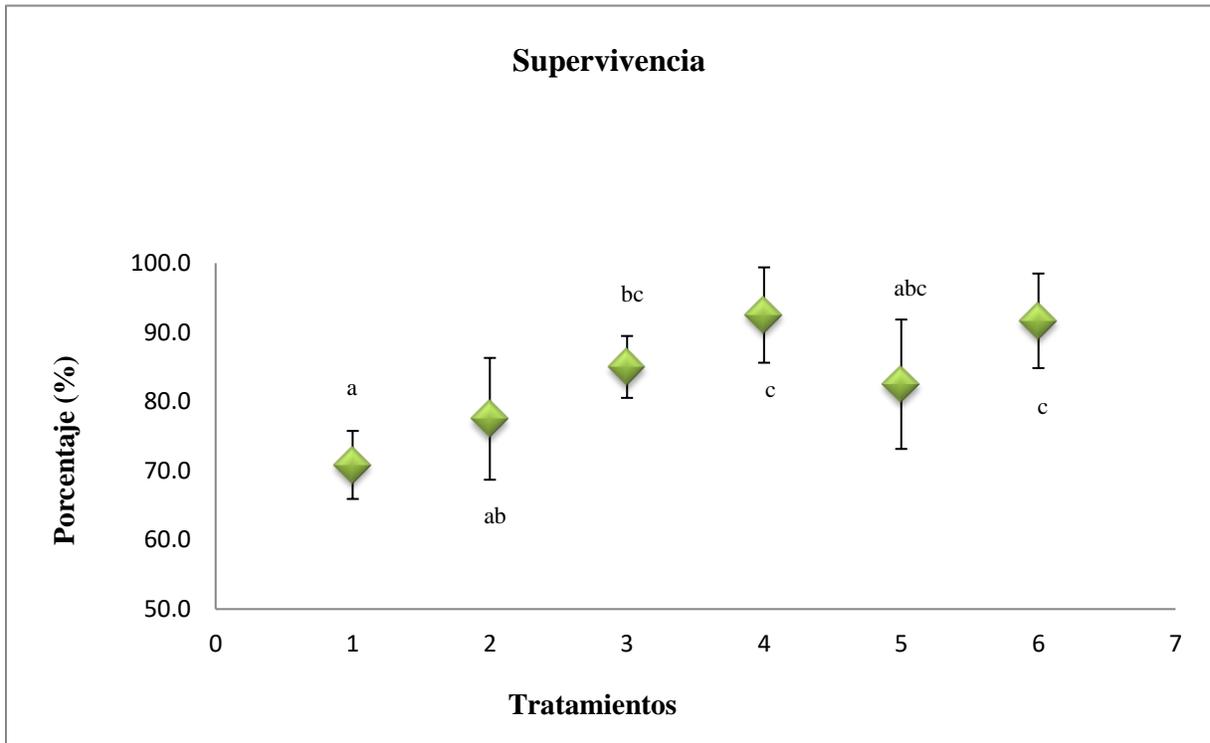


Figura 9. Supervivencia promedio de los tratamientos (T1 – T6).

Los valores de pesos finales (g) y SGR analizados por medio del ANOVA no indicaron diferencias significativas (tabla 20) entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 20. Datos de supervivencia (%), ganancia de peso y SGR (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Supervivencia	70.8 \pm 4.9 ^a	77.5 \pm 8.8 ^{ab}	85.0 \pm 4.5 ^{bc}	92.5 \pm 6.9 ^c	82.5 \pm 9.4 ^{abc}	91.7 \pm 6.8 ^c
Peso final (g)	7.47 \pm 1.9 ^a	7.18 \pm 1.5 ^a	7.31 \pm 1.6 ^a	7.33 \pm 1.5 ^a	6.97 \pm 1.6 ^a	7.31 \pm 1.3 ^a
SGR	1.78 \pm 0.1 ^a	1.71 \pm 0.1 ^a	1.75 \pm 0.1 ^a	1.75 \pm 0.07 ^a	1.67 \pm 0.1 ^a	1.73 \pm 0.1 ^a

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

10.3.2.- Biomasa, TCA y TEP

En relación a la biomasa, el ANOVA indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), obteniendo los mayores valores con el T₄ y T₆ (ver Figura 10 y tabla 21).

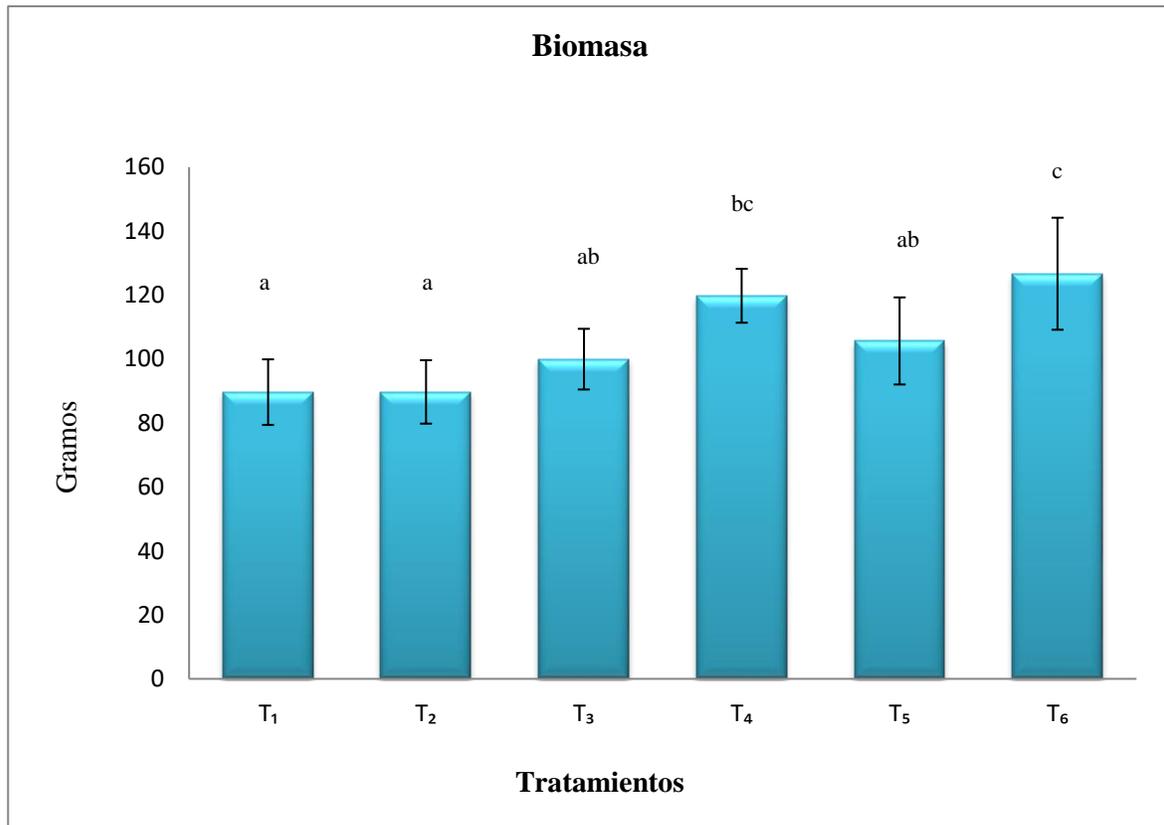


Figura 10. Biomasa promedio de los tratamientos (T1 – T6).

Los promedios de tasa de conversión alimenticia (TCA) y la tasa de eficiencia proteínica (TEP) evaluados mediante el análisis de varianza indicaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), ver tabla 20.

Tabla 21. Datos de biomasa, TCA y TEP (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Biomasa (g)	89.6 \pm 10.2 ^a	89.7 \pm 9.9 ^a	99.9 \pm 9.4 ^{ab}	119.7 \pm 8.4 ^{bc}	105.6 \pm 13 ^{ab}	126.6 \pm 17.5 ^c
TCA	7.8 \pm 2.9	8.3 \pm 3.7	4.6 \pm 1.3	3.1 \pm 0.4	4.1 \pm 1.8	2.2 \pm 0.8
TEP	0.3 \pm 0.1	0.34 \pm 0.1	0.55 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.3

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

10.3.3.- Textura

El ANOVA, para el análisis de textura (resistencia a la penetración), no indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Los promedios de milijoules (mJ) obtenidos en el análisis de textura de los tratamientos (T₁-T₆) se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Datos de textura (resistencia al corte) (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Textura (mJ)	79.4 \pm 12.1 ^a	73.5 \pm 13.1 ^a	81.3 \pm 13.1 ^a	78.8 \pm 21.9 ^a	69.7 \pm 10.1 ^a	74.5 \pm 12.0 ^a

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

10.3.4.- Balance bioenergético

En lo que respecta a los valores de energía basal (HeE) y de incremento de calor aparente (HiE) el ANOVA no indicó diferencias significativas (tabla 23) entre los tratamientos ($p > 0.05$). No obstante, el análisis estadístico indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) para el factor de la energía retenida (RE).

Tabla 23. Balance bioenergético (Promedios \pm error estándar).

	ED	HeE	HiE	UE +ZE	RE	SE	HxE
T ₁	8.3 \pm 0.4	6.7 \pm 0.9 ^a	0.8 \pm 0.3 ^a	0.6 \pm 0.04 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.01 ^a	0.1 \pm 0.09 ^a
T ₂	5.5 \pm 2.4	4.2 \pm 1.9 ^a	0.6 \pm 0.4 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.1 ^{ab}	0.20.06 ^a	0.1 \pm 0.003 ^{ab}
T ₃	6.4 \pm 1.6	4.4 \pm 1.4 ^a	1.1 \pm 0.1 ^a	0.5 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.0 ^{ab}	0.2 \pm 0.04 ^a	0.1 \pm 0.0 ^{ab}
T ₄	4.6 \pm 1.2	2.9 \pm 0.9 ^a	0.9 \pm 0.2 ^a	0.3 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.009 ^b	0.1 \pm 0.03 ^a	0.1 \pm 0.002 ^b
T ₅	5.8 \pm 1.3	3.8 \pm 2.0 ^a	1.4 \pm 1.1 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.01 ^b	0.2 \pm 0.03 ^a	0.1 \pm 0.003 ^b
T ₆	7.5 \pm 2.4	6.3 \pm 2.8 ^a	0.5 \pm 0.4 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.02 ^{ab}	0.2 \pm 0.07 ^a	0.1 \pm 0.007 ^{ab}

*Los valores se presentan en KJ día⁻¹ animal⁻¹**Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

En la figura 11 se representan los porcentajes (%) de distribución de energía de los organismos alimentados con los tratamientos (T₁-T₆). Los mayores valores de energía canalizada al crecimiento o RE fueron obtenidos en el T₄ con el 6%, y el mayor HiE se determinó en el T₅.

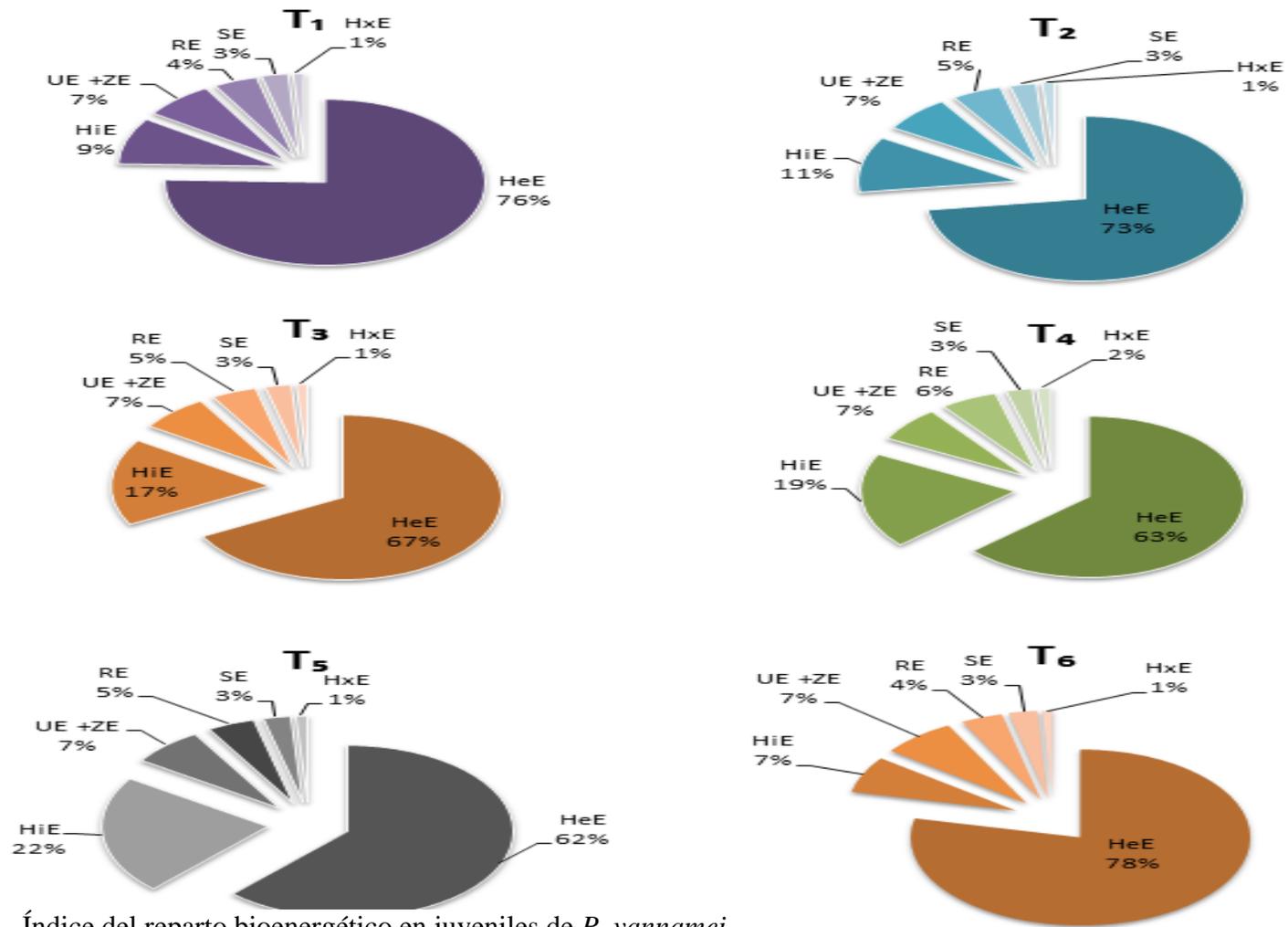


Figura 11. Índice del reparto bioenergético en juveniles de *P. vannamei*.

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

En la tabla 24 se presentan los valores promedios obtenidos para la concentración de proteína soluble en los tratamientos (T₁-T₆), los valores se expresan en mg/g de tejido de glándula digestiva (mg/g GD). Los cuales no presentaron diferencias significativas (p>0.05) al ser analizados estadísticamente.

Tabla 24. Promedios de concentración de la proteína soluble ± error estándar.

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Proteína soluble	15.4±1.1 ^a	14.2±4.4 ^a	15.0±3.2 ^a	15.49±7.3 ^a	13.1±9.3 ^a	11.6±4.3 ^a

*Los valores se presentan en mg/g de tejido de glándula digestiva (mg/g GD).

En lo que respecta a la actividad específica de la tripsina proveniente del hepatopáncreas de los juveniles de *P. vannamei*, el ANOVA no indicó que hubo un efecto significativo por acción de la dieta (p>0.05), ver tabla 25. No obstante, se presentó un ligero aumento de la actividad específica de la tripsina en el tratamiento 5.

De igual manera, el análisis estadístico de los valores de actividad de la quimotripsina hepatopancreática no indicó diferencias significativas (p>0.05) entre los tratamientos. En la tabla 24 se presentan los valores promedios obtenidos para la actividad de quimotripsina en estadios C y D0.

Tabla 25. Promedios de actividad de tripsina y quimotripsina (Promedios ± error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Tripsina	5.3±2.0 ^a	6.2±2.0 ^a	6.3±1.0 ^a	5.3±1.6 ^a	12.6±4.8 ^a	7.4±0.9 ^a
Quimotripsina	16.8±3.3 ^a	8.4±2.8 ^a	23.8±7.4 ^a	14.8±4.8 ^a	15.7±3.9 ^a	10.0±3.8 ^a

*Los valores se presentan en U/g de tejido de glándula digestiva (U/g GD).

10.3.6.-. Cuento total de hemocitos (CTH) Y Presión Osmótica (mOsm).

En la tabla 26 se muestran los valores promedios obtenidos del CTH y mOsm en la hemolinfa de los juveniles de *P. vannamei* alimentados con los diferentes tratamientos. El ANOVA para la concentración de hemocitos en la hemolinfa no indicó diferencias significativas entre los organismos alimentados con las dietas experimentales y el alimento comercial ($p > 0.05$). Así mismo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre la mOsm de los tratamientos evaluados.

Tabla 26. Promedios del CTH y mOsm (Promedios \pm error estándar).

	CTH (10×10^6)	Presión Osmótica (mOsm/Kg)
T ₁	2.3 ± 0.7^a	890.0 ± 31.4^a
T ₂	2.4 ± 0.5^a	922.5 ± 55.9^a
T ₃	2.6 ± 0.3^a	907.0 ± 33.4^a
T ₄	2.4 ± 0.2^a	900.5 ± 23.4^a
T ₅	2.9 ± 0.6^a	896.8 ± 35.6^a
T ₆	2.3 ± 0.6^a	918.3 ± 22.4^a

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

10.3.7.-. Superóxido dismutasa (SOD) en músculo de camarón

Los valores de la actividad SOD fueron evaluados mediante el ANOVA, e indicó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$). La actividad de SOD más baja se presentó en el T₂ con un valor de 8.1, en comparación del 11.6 del T₆ (ver tabla 27 y figura 12).

Tabla 27. Promedios de actividad SOD (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
SOD	8.4 ± 1.3^a	8.1 ± 2.2^a	9.9 ± 1.2^b	9.5 ± 1.8^b	9.1 ± 1.0^b	11.6 ± 1.1^b

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

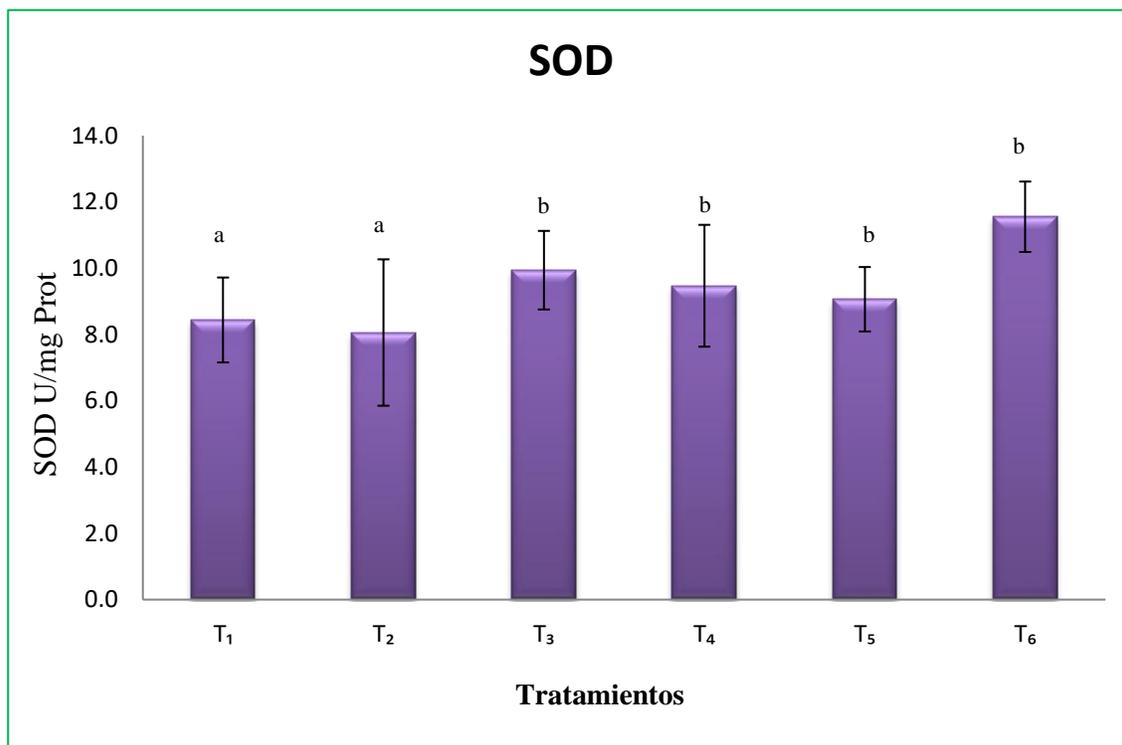


Figura 12. Actividad SOD (T1 – T6).

10.3.8.- Calidad del alimento

10.3.8.1 Análisis químico proximal

En la tabla 28 se muestra la composición química proximal de las dietas experimentales.

Tabla 28. Composición proximal de los alimentos experimentales

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Proteína	33.81	35.21	34.58	35.73	36.11	36.11
Fibra	3.07	2.85	2.53	3.32	4.65	3.73
Grasas	6.86	6.87	7.78	6.09	7.75	7.5
Cenizas	8.64	9.01	8.64	10.34	11.18	9.24
Humedad	5.62	6.38	4.89	6.34	5.84	5.84

Los resultados se expresan en %.

10.3.8.2.- Determinación de estabilidad en el agua (Hidroestabilidad).

En la tabla 29 se muestran los valores promedios obtenidos en el análisis de la materia seca retenida (MSR) o hidroestabilidad del alimento. El ANOVA, para la MSR no indicó diferencias significativas entre las dietas experimentales y el alimento comercial ($p > 0.05$).

Tabla 29. Datos de MSR (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
MSR	87.3 \pm 10.1 ^a	88.9 \pm 12.3 ^a	89.2 \pm 9.09 ^a	88.1 \pm 10.2 ^a	84.9 \pm 8.6 ^a	92.0 \pm 6.1 ^a

*Los resultados se expresan en %. **Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

10.3.8.3.- Análisis de dureza del alimento.

El ANOVA para el grado de dureza o compresión del pelet indicó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el alimento comercial y los tratamientos T₁, T₂, T₄ y T₅. El tratamiento tres presentó un rango de compresión cercano al del alimento comercial, ver tabla 30.

Tabla 30. Datos de dureza de los alimentos (Promedios \pm error estándar).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
mJ	34.5 \pm 9.3	36 \pm 21.2	19.5 \pm 7.7	35.8 \pm 6.4	47.9 \pm 7.9	15.6 \pm 10.1

*Los resultados se expresan en .mJ. **Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

10.4.-DISCUSIÓN.

Las harinas vegetales han sido evaluadas como una estrategia a la sustitución parcial y/o total de la harina de pescado utilizada en la alimentación de diversos organismos acuáticos (Olvera *et al.*, 2000; Oujifard *et al.*, 2012). Los resultados alcanzados y el nivel de inclusión han dependido de la especie, la talla del organismo y los hábitos alimenticios (Davis *et al.* 2002). En el presente trabajo se evaluaron cinco niveles de sustitución de la harina de pescado por fuentes vegetales (Soya y Canola), obteniendo resultados positivos en los diferentes parámetros evaluados. Resultados similares son reportados por Olimpia *et al.*, (2007), cuando camarones peneidos son alimentados con fuentes vegetales en un nivel sustitución de 11 al 50% de la harina de pescado. No obstante, la mayoría de los bioensayos son contrastados con una dieta control elaborada en las mismas instalaciones, sin considerar las características (dureza, lixiviación, tamaño de partícula) propias de un alimento comercial.

La presente investigación ha demostrado la factibilidad de alimentar juveniles de *P. vannamei* con diferentes niveles de harina de pescado (25, 20, 15, 10, 5 %) en dietas a base de soya y canola, e inclusión de fitasa Ronozyme para mitigar el efecto negativo del ácido fítico presente en las fuentes vegetales. Los resultados muestran que las ganancias de peso no se vieron afectadas por el nivel de sustitución de la harina de pescado, ~~obteniendo un peso promedio de 7.2 ± 1.6 g.~~ De igual forma, Álvarez (2015) no reportó un efecto negativo cuando juveniles de *Litopenaeus schmitti* fueron alimentados con dietas con 75% de remplazo de harina de pescado por harina de soya, y Oujifard *et al.*, (2012) indicaron que dietas con 50% de harina de arroz promovieron el crecimiento de *P. vannamei* superando al tratamiento control. Sin embargo, la ganancia de peso promedio semanal de nuestro estudio fue de $.54 \pm 0.2$ g, inferior a lo obtenido por Foster y Dominy (2002), los cuales determinaron que juveniles de *P. vannamei* alimentados con dietas vegetales enriquecidas con metionina presentan una tasa de crecimiento de 1 g/semana. La baja ganancia de peso semanal obtenida en el ensayo no debería ser atribuida al efecto dieta, ya que incluso los organismos del tratamiento seis (alimento comercial) se mantuvieron en el mismo margen de ganancia de peso. Lo cual, hace pensar que la densidad utilizada (20 organismos/tina) en el bioensayo es

el factor limitante en el crecimiento, al representar una densidad equivalente a 71 camarones/m² misma que es utilizada en los sistemas de cultivos intensivos. Por otro lado, Ambasankar *et al.*, (2006) reporta que altos niveles de suplementación de fósforo suprime el crecimiento, aumenta la tasa de conversión alimenticia e incrementa de manera lineal la excreción de P conforme aumente más del nivel óptimo (1%) requerido en *P.monodon*.

En los antecedentes (tabla 2 y 3), se estableció que la supervivencia de camarones peneidos alimentados con fuentes vegetales (soya y canola) no se ve afectada con respecto a la dieta control. No obstante, en nuestros tratamientos se obtuvieron diferencias en los índices de supervivencia. En donde, el tratamiento con 25 % de harina de pescado presentó los índices más bajos (70.8 %), en comparación con el 92.5 % de supervivencia obtenida en la dieta con 10 % de proteína animal marina. Estos resultados difieren a los reportados por Samocha *et al.*, (1997) con un 95% de supervivencia cuando los camarones fueron alimentados con un extruido de soya, y los de Chorn y Warren (1989) al sustituir del 20 al 100% la proteína animal (anchoveta) por proteína vegetal (soya) en dietas para *P. vannamei*, y mantener una supervivencia entre el rango de 86.7 y 98.3 %. La supervivencia de los organismos alimentados con la dieta comercial (T₆) fue de 91.7%, permitiendo suponer que en términos generales los juveniles de *Penaeus vannamei* alimentados con 10 % de harina de pescado en dietas a base de proteína vegetal presentaron buenas condiciones de salud durante el período experimental.

En ese mismo contexto, Rosas *et al.*, (2000) reportaron que aquellos individuos que reciban los mayores beneficios después de haber pagado los costos metabólicos necesarios para mantenerse vivos tendrán la mayor masa y energía por unidad de tiempo necesaria para ser llevada a la producción de biomasa corporal. Lo cual es concordante con los resultados del T₄, en donde, además de presentar los mejores índices de supervivencia (92.5 %) se presentó la mayor biomasa (119.7g) de los tratamientos experimentales.

Desde un punto de vista del balance bioenergético, se puede establecer que el tratamiento T₄ mostró un mayor porcentaje (6%) de energía canalizada al crecimiento (RE), a diferencia del T₁. Por otra parte, los valores HeE obtenidos en este estudio, reflejan que el T₅ mostró un

menor requerimiento de energía porque los camarones presentaban una tendencia de menor talla, a diferencia del T₆, donde los camarones eran más grandes; por lo tanto, HeE de este último fue superior a los valores en los distintos tratamientos. Así mismo, el HiE reveló que la baja inclusión de harina de pescado (5%) y los altos niveles de fitato provenientes de las harinas vegetales en el T₅ provocaron un mayor requerimiento de energía (22%) para metabolizar los nutrientes, en comparación con los T₁ a T₄ que requirieron menor energía, debido a la menor proporción de fuentes vegetales y misma dosis (.5 g/kg alimento) de fitasa Ronozyme. El menor valor de HiE (7%) se obtuvo en el T₆, esto pudo ser debido a la baja concentración de ingredientes vegetales y a los procesos propios de la fabricación de un alimento comercial. Díaz *et al.*, (2012) indicaron que organismos de *Cherax quadricarinatus* alimentados con proteína animal presentaron un mayor ICA y una menor RE en comparación con los tratados con proteína vegetal (38% soya y 14% de zanahoria como sustrato vegetal). Por otro lado, Suárez *et al.*, (2012) no reportó diferencias en los índices de HeE y HiE cuando los camarones eran alimentados con diferentes fuentes y niveles de proteína vegetal. Beamish & Trippel (1990) en Valdez *et al.*, (2008) mencionan que los factores que modifican la magnitud del incremento aparente de calor, resultado de la ingestión de alimento, dependen de la naturaleza de la dieta, el tamaño, la ración y la composición química del alimento.

En general, la mayoría de los bioensayos realizados para evaluar diversas fuentes y niveles de sustitución de la harina de pescado están basados en el efecto sobre los parámetros zootécnicos (crecimiento, supervivencia y SGR), sin considerar si el sistema inmune y calidad del músculo se ven comprometidos.

Velurtas *et al.*, (2001), reportaron que la calidad y el tipo de proteína es esencial en la nutrición de los camarones peneidos al influir de manera directa en el crecimiento, regulación y presión osmótica. Así mismo, Rosas *et al.*, (2002) establecieron que la variación de los nutrientes en un alimento se ve reflejado en la hemolinfa, permitiendo ser un buen indicador general del estado fisiológico del organismo. Además, la hemolinfa es el primer componente involucrado en los mecanismos de defensa de los crustáceos (Pascual *et al.*, 2003; Velurtas *et al.*, 2011). Nuestros resultados, indicaron que el sistema inmune evaluado mediante el conteo total de hemocitos (CTH), SOD (Superóxido dismutasa) y presión osmótica (mOsm)

no se ve afectado ante la sustitución de la proteína animal por proteína vegetal. Resultados contrarios son reportados Rodríguez *et al.*, (2000) al reportar cantidades de hemocitos decrecientes por efecto de la dieta, y por Olmos *et al.*, (2011) al establecer que existe un aumento de la concentración de hemocitos cuando los organismos son alimentados con soya y CHO (2.02×10^7) en comparación de los tratados con una dieta comercial (9.63×10^6), señalando que la presencia de factores antinutricionales en la harina de soya pudiera obstaculizar la digestión y absorción de la proteína.

Pascual *et al.*, (2004) señalaron que la funcionalidad del sistema inmune es afectada por la proteína en la dieta, incrementando la concentración de hemocitos en los camarones. Así mismo, Chiu *et al.* (2007) en Villamil & Martínez (2009) informaron que complementos alimentarios aumentaron el estallido respiratorio y la actividad de SOD, lo que contribuyó a su resistencia ante el infecciones experimentales de *Vibrio alginolyticu*. Sánchez *et al.*, (2013) establecieron que un aumento de la actividad de SOD en postlarvas de *P. vannamei* indica la estimulación del sistema inmune. Lo cual, permite pensar que las dietas cubrieron los requerimientos nutricionales de los organismos, y que la inclusión de fitasa Ronozyme elimina o disminuye el efecto adverso del fitato u otros factores antinutricionales de la soya y canola. Von *et al.*, (2015), llegaron a una conclusión similar, al realizar un estudio con diferentes niveles de fitasa (1000-2000 FTU/Kg) en dietas vegetales para *Psetta maxima L.*, indicando que la suplementación de fitasa en dietas ricas en proteína vegetal aumenta el crecimiento, la digestibilidad y utilización de los nutrientes al igual que minimiza la emisión de nutrientes al medio.

Rutherford *et al.*, (2012) reportaron que principalmente el fósforo y los aminoácidos son los nutrientes que aumentan su digestibilidad en presencia de las fitasa exógenas. Por otra parte, Romero-Núñez *et al.*, (2009) indicaron un efecto positivo de la fitasa en la digestibilidad de las proteínas, pero no pudo ser correlacionado con la actividad de las enzimas (Tripsina y Quimotripsina). El incremento de actividad de la tripsina al usar ingredientes vegetales se ha atribuido al contenido del inhibidor de tripsina, al ocasionar una sobreproducción de esta enzima, Fonema (1996). En cuanto a la quimotripsina, Le Moullac *et al.*, (1994) indican que su actividad no se ve afectada por el nivel de proteína, pero si por la fuente de proteína.

Nuestros resultados no mostraron un efecto por el factor dieta y fitasa en la concentración de la proteína soluble, actividad específica de la tripsina y quimotripsina. Siendo contrarios a los resultados obtenidos por Rivas (2006) al determinar una relación proporcional de estas enzimas y la inclusión de harinas vegetales en dietas para *P. vannamei*, en donde la tripsina aumento y quimotripsina disminuyó significativamente. Así mismo, Nolasco & Villasante., (2000) al evaluar la actividad de proteasas generales, tripsina y quimotripsina, indicaron que no hubo diferencia entre organismos de camarones peneidos alimentados y organismos mantenidos en ayuno. Lo anterior fue atribuido por los investigadores al no considerar el estadio de muda de los organismos utilizados para la determinación de la actividad enzimática.

Sin duda, la correcta formulación de un alimento permite un adecuado desarrollo del organismo, e influye en no solo los procesos digestivos y el sistema inmune, sino también la formación de nutrientes específicos y la bioacumulacion de compuestos, los cuales influyen en la calidad del músculo (Haard, 1992). La textura (firmeza o resistencia al corte) del músculo de los organismos marinos es un importante atributo sensorial que determina la calidad o aceptación de los productos con alto valor comercial (Tamarit., 2008), y está relacionada con la calidad de proteína alimentaria y su influencia sobre las proteínas estromales (colágeno) (Ezquerria *et al.*, 2004). El estudio no reflejó diferencias en la calidad del músculo, independientemente del nivel de sustitución y tipo de proteína. De igual forma, Palma (2015) no reportó diferencias significativas en el perfil de textura al comparar camarones de *P. vannamei* alimentados con dos fuentes de proteína animal marina (harina de pescado o Callo de hacha "*Atrina maura*"). Galindo (1999) establece que las fuentes proteínicas de origen animal o vegetal pueden ser utilizadas indistintamente, siempre y cuando se logre un balance adecuado entre los diferentes nutrientes.

Cruz *et al.*, (2000) indicaron que la relación proteína animal/vegetal en la dieta es determinante para la estabilidad del alimento, concluyendo que en los alimentos con 30% de proteína, en su mayoría proteína animal (60/40), la estabilidad de los alimentos fue significativamente mejor con 3.6 % en promedio de perdida de materia seca (PMS). Lo

anterior fue atribuido a la proporción de Ca (proveniente de la harina de pescado) y de trigo en el alimento, ya que el Ca funciona como un agente polimerizante formador de gel y el trigo como aglutinante. Nuestros resultados (91% en promedio de MSR) difieren de lo anterior, al no reflejar un efecto entre la hidrostabilidad y el nivel de remplazo de la harina de pescado o sus equivalentes en relación proteína animal/vegetal (54/46, 40/60, 31/69, 20/80 y 8/92). Sin embargo, los pellets de las dietas experimentales presentaron un mayor índice de dureza o resistencia a la compresión en comparación con el alimento comercial.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten establecer que juveniles de *P. vannamei* pueden ser alimentados con dietas a base de fuentes vegetales tratadas con fitasa, permitiendo sustituir el uso de la harina de pescado y minimizando la excreción de fósforo fítico. La falta de atractabilidad atribuido a los altos niveles de inclusión de fuentes vegetales en las dietas, puede ser solucionada mediante el uso de la betaína. Mercan (2014) reporta que la adición de betaína en la dieta de camarones, permite un incremento en el crecimiento y eficiencia alimenticia. Penaflores y Virtanen (1996) indican que las propiedades osmoprotectoras y metabólicas de la betaína, aumentan la palatabilidad y el crecimiento en *Penaeus monodon*.

10.5.- CONCLUSIONES.

- La inclusión de fitasa Ronozyme P5000 CT en dietas vegetales (pastas de soya y canola) enriquecidas con fósforo inorgánico (Premix y CaHPO_4) e incorporación de betaína como attractante, no repercutió de manera negativa en el crecimiento e indicadores inmunológicos (CTH, SOD y mOsm).
- La inclusión de fitasa (Ronozyme) en la dieta con el 10% de harina de pescado e inclusión de soya y canola favoreció la supervivencia y los índices de biomasa de los camarones juveniles de *P. vannamei*.
- La inclusión de Ronozyme en las harinas vegetales (soya y canola) no afectó la concentración de proteína soluble presente en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*. De igual manera, la actividad específica de la tripsina y quimotripsina no reflejaron un efecto negativo.
- La HeE y HiE del balance bioenergético no reflejó un efecto negativo por la inclusión de fitasa Ronozyme. Los mayores valores de RE fueron obtenidos en la dieta con el 10% de harina de pescado e inclusión de soya y canola.
- Los camarones de *P. vannamei* en etapa juvenil tiene la capacidad de aprovechar de una manera eficiente los nutrientes de las harinas de soya y canola tratadas con fitasa, sin verse afectada la calidad del músculo.

XI. CONCLUSIONES GENERALES

- La inclusión de fitasa por el método de pretratamiento con FTEII y/ o la inclusión directa de Ronozyme en dietas a base de harinas de soya y canola, facilitó la biodisponibilidad de fósforo y proteínas que forman complejos con el fitato, representando así una dieta viable para el cultivo de juveniles de *P. vannamei*. Sin embargo, debido a la disponibilidad en el mercado y la practicidad en la elaboración del alimento se opta por el uso de la fitasa Ronozyme.
- El fósforo producto de la hidrolisis del fitato en las harinas vegetales no sustituye la incorporación del fósforo inorgánico en las dietas libres de harina de pescado para los juveniles de *P. vannamei*.
- Los juveniles de *P. vannamei* pueden ser alimentados con una dita alterna a la comercial (Api camarón), ya que tienen la capacidad de aprovechar de una manera eficiente los nutrientes de las dietas vegetales tratadas con fitasa, enriquecidas con fósforo inorgánico (Premix y CaHPO_4) e incorporación de betaína, como attractante.
- Se recomienda realizar un análisis bioeconómico, y evaluar la cantidad de fósforo liberado en el medio de cultivo de los distintos tratamientos

XII.- LITERATURA CITADA

1. Adler-Nissen, J., 1986. Enzymatic hydrolysis of food protein. Elsevier, London, 427 pp
2. Association of Official Analytical Chemists (AOAC)., 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
3. Barros, A., Alarcón, F., Moyano, F.Y Martínez, T., 2002. Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis *in vitro* de la proteína en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18: 95-98 pp.
4. Biswas, P., Pal, A.K., Sahu, N.P., Reddy, A.K., Prusty, A.K., Misra, S., 2007. Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. Aquaculture 265: 253–260 pp.
5. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 pp.
6. Briggs, A.P., 1924. Some applications of the colorimetric phosphate method. J. Biol. Chem., 59:255-264
7. Buchanan, J. Sarac, H. Z., Poppi, D., Cowan, R.T., 1997. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. Aquaculture 151: 29-35 pp.
8. Bureau, B.P., Azevedo, P.A., Tapia-Salazar, M., Cuzon, G., 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
9. Cabrera, M., Puerto, M., Ramos, A., Saadoun, A. Y Marchesoni, A., 2002. Evaluación de la biodisponibilidad del fósforo orgánico e inorgánico a través de la solubilidad *in vitro* y utilización *in vivo*. Agrociencia.6:69-78 pp.
10. Carrillo, O., 2007. Manual de ingredientes protéicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editores: Tsai García Galano, Humberto Villarreal-Colmenaresy Jorge L. Fenucci. Editorial Universitaria de Mar del Plata. Argentina.
11. Civera, R. and Guillaume, J., 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 77: 145-156 pp.

12. Colvin, L.B. y Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various
13. life-cycle stages in controlled environment systems. *Journal World Mariculture Society* 8:821 pp.
14. Cousin, M., Cuzon, G., Gillaume, J., AQUACOP.,1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. *Aquaculture* 140: 361-372 pp.
15. Cruz, L., Ricque, D., Tapia-, M., McCallum, I. M. Y Hickling, D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196:87-104 pp.
16. Cuzon, G. & Faucon, E., 1998. Report interne Ifremer. 52 pp.
17. Cuzon, G, Brito, A., Jiménez-Yan, L, Brito· R., García, T, Taboada, G, 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 Symposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Hermosillo, Sonora.
18. Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 8: 87-94 pp.
19. Davis, D.A., A.L. Lawrence and D.M. Gatlin III., 1993. Dietary zinc requirement of *Penaeus vannamei* and the effects of phytic acid on zinc and phosphorus bioavailability. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:40-47 pp.
20. Davis, N. y Oplin, S., 1979. Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of zinc availability to young rats. *Br. J. Nutr.* 41:591-603 pp.
21. Denstadli, V., Storebakken, T., Svihus, B. y Skrede A., 2007. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in cold water. *Aquaculture* 269: 414–426 pp.
22. Devresse, B., 2000. Producción de alimentos para camarón estables en el agua. pp 526-539 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez- Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
23. Divakaran, S. y Ostrowski, A., 1998. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Caryphaena hippurus*. *J.W.A.S.*21: 35-40 pp.
24. Dominy, W.G. y Lim, Ch., 1991. Evaluation of soybean meal extruded with squid viscera as a source of protein in shrimp feeds. En: Akiyama, D.M, Tan, R.K.H (Eds.)

- Proceedings of the Aquaculture feed processing and nutrition workshop. Tailandia e Indonesia, Septiembre 19-25 pp.
25. FAO., 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
 26. Fennuci, J., A., Lawrence, A.I, Zein Eldin, Z.P., 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp *Penaeus stylirostris*. J. World Mariculture, 13: 134-145 pp.
 27. Fiske, .C.; y Subbarow., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Bioi. Chern. 66:375 pp.
 28. Gamboa J., 2001. Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y preferencia alimenticias. Tesis para obtener el grado de magister en ciencias en acuicultura marina. Escuela Superior Politecnica Del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 1-8 pp.
 29. Gamboa J., 2011. Efecto de la fitasa en dietas basadas en proteína vegetal en la fisiología digestiva, el crecimiento y la supervivencia de *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología Universidad Nacional Autónoma de México.México, D.F.
 30. Gaxiola, G., Arena L., Brito, A., Garfias, S., Maldonado., C., Arevalo, M., Taboada G., y Cuzon, G. 2005. Alimentos amigables con el ambiente en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Capítulo Latinoamericano de la Sociedad Americana de Acuicultura, 12-14 de septiembre, Mérida, Yucatán
 31. Geiger, R., 1988. Chymotrypsin. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol V. e d. Bergmeyer, J. And Grab, I.M. 99-104 pp.
 32. Geiger, R. and Fritz, H., 1988. Trypsin. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol V. e d. Bergmeyer, J. And Grab, I.M. 119-124 pp.
 33. Gómez-Villalva. 2005. Transformación y mejora del valor nutritivo de la harina de guisante mediante la adición de enzima fitasa. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
 34. Greiner R. y Konietzny U., 2006. Phytase for food application. Food Technol. Biotechnol. 44 (2): 125–140 pp.
 35. Guerrero, M., Rodríguez, L.Y Viader, J., 2007. Producción de una fitasa recombinante en *Pichia Pastoris*. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.10:413-418 pp.

36. Guerrero Olazarán, M. *et al.*, 2008. Desarrollo de una Fitasa Bacteriana Recombinante para su Aplicación en la Nutrición Acuícola. 470 - 491 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México
37. Hardy, R., 1999. Alternative protein sources. *Feed Managements*.50:25-28 pp.
38. Hardy, R., 2008. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of grains and oilseeds. Pp.6-12. Editores: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto, M., Lazo, J. y Viana, M. Avances En Nutrición Acuícola IX. Simposio Internacional De Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma De Nuevo León, Monterrey, México.
39. Harter-Denis, J., 1999. En: Biotechnology in the feed industry. Proc. Alltech's 15th Annual Symposium. Ed. T.P. Lyons y K.A. Jacques. Nottingham University Press. 511-522 pp.
40. Hernández, G., Godoy, S. y Chicco, C., 2006. Biodisponibilidad del fósforo de cereales en aves. *Revista Científica, FCV-LUZ*.16:149-154 pp.
41. Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Beames, R.M., Prendergast, A.F., Mwachireya, S.A., Deacon, G., 1996. Nutritive value of rapeseed/canola protein products for salmonids. In Eastern Nutrition Conference, Halifax, Canada, May 15-17. 187-196 pp.
42. Jiménez L., 2004. Alimentos amigables con el ambiente y su efecto en el crecimiento, supervivencia y estado fisiológico de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis para obtener el grado de ingeniero en acuicultura. Universidad Juárez Autónoma De Tabasco, Mexico..1-29 pp.
43. Jiménez-Yan L., Brito A., Cuzon G., Gaxiola G., García T., Taboada G., Soto L. A., Brito R., 2006. Energy balance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae fed on animal or vegetable protein based compounded feeds. *Aquaculture* 260: 337-34 pp.
44. Koss, M., 1979. A study of the protein, zinc and phytate contents of a number of protein source and the molar ratio phytate: zinc for the determination of zinc bioavailability, and its relation to the nutrient fortification of vegetable protein products. Tesis M.Sc, London, University Of Reading, Department of Food Science.
45. Kumaraguru K., Ramesh S., y Balasubramanian T., 2005. Dietary value of different vegetable oil in black tiger shrimp *Penaeus monodon* in the presence and absence of soy lecithin supplementation: Effect on growth, nutrient digestibility and body composition / *Aquaculture* 250: 317–327 pp.

46. Lawrence, L.A., Castille, I.F., Sturmer, N.I. y Akiyama, M.D., 1986. Nutritional response of marine shrimp to different levels of soybean meal in feeds. En: Akiyama, D.M., American Soybean Association, Singapore 9 pp.
47. Lee, P.G. y S.P. Meyers., 1996. Chemoattraction and feeding stimulation in crustacea. *Aquacult. Nutr.* 2:157-164 pp.
48. Lim, C., Akiyama, D.M., 1992. Full-fat soybean meal utilization by fish. *Asian Fish. Sci.* 5:181–197 pp.
49. Maldonado C., 2011. Efecto de alimentos ricos en proteínas vegetales, en la nutrición, fisiología digestiva y balance bioenergético en reproductores y postlarva de *Litopenaeus vannamei*. Tesis. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
50. Martínez, B., Ibáñez M. Y Rincón, F., 2002. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.*52:219-232 pp.
51. Mendoza, R., Aguilera, C. y Montemayor, J., 2000. Utilización de subproductos avícolas en las dietas para organismos acuáticos. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. 398-439 pp.
52. Molina C. y Lucas M., 2007. Manual de ingredientes protéicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editores: Tsai García Galano, Humberto Villarreal-Colmenares y Jorge L. Fenucci. Editorial Universitaria de Mar del Plata. Argentina.
53. Nieto-López, M., Cruz-Suarez, L., Ricque-Marie, D. Y Ezquerro B.M., 2005. Técnica de digestibilidad *in vitro* en ingredientes y alimentos para camarón. *Revistas Ciencias-UANL*, 1:371-378 pp.
54. Phillippy B., 1999. Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* phytases to inactivation by gastrointestinal enzymes. *J. Agric. Food Chem.*47, 1385-1388 pp.
55. Ramos R, I Miranda, Molina C., 2001. Consumo y digestibilidad aparente de tres ingredientes marinos locales incorporados en dietas practicas para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931). Departamento de Acuicultura., Facultad De Recursos Del Mar, Universidad De Antofagasta, Casilla 170, Antofagasta, Chile..1-2 pp.
56. Rebollar, P.G. y Mateos, G. G., 1999. El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. En *Curso de Especialización FEDNA: Avances en nutrición y alimentación animal.* Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Eds.: P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Madrid, España.

57. Tacon, A., 2008. Compound aqua feeds in a more competitive market: alternative protein sources for a more sustainable future. 1-55 pp. Editores: En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto, M., Lazo, J. y Viana, M. Avances En Nutrición Acuícola IX Simposio Internacional De Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma De Nuevo León, Monterrey, México.
58. Tacón, A.G.J., Foster, I.P., 2000. Global trends and challenges to aquaculture and aqua feed development in the new millennium. International Aqua feed Directory and Buyers' Guide. 4-25 pp.
59. Tacon, A.G.J., Haaster, J.V., Featherstone, P.B., Kett, K. y Jackson, A.J., 1983. Studies on the utilization of full-fat soybean and solvent extracted soybean meal in a complete diet for rainbow trout. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 49: 1437-1443 pp.
60. Taussky, H.H., Shorr, E., 1953. A micro colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. Journal Biological Chemistry. 202: 675-685 pp.
61. Viader-Salvadó, J.M., Gallegos-López, J.A., Carreón-Treviño, J.G., Castillo-Galván, M., Rojo-Domínguez, A., Guerrero-Olazarán, M., 2010. Design of thermostable beta-propeller phytases with a broad range of pH activity and their overproduction by *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol. 76 (19): 6423–6430 pp.
62. Vohra, A. y Satyanarayana, T., 2003. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications, Critical Reviews in Biotechnology. 23:1- 60 pp.
63. Zar, J., 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Forth edition, New Jersey, 661 pp.
64. Herath, S. S., & Satoh, S. (2015). Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. Feed and Feeding Practices in *Aquaculture*, 369–386.
65. FAO. 2022. Versión resumida de El Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma. FAO.
66. Gaxiola G., et al 2006
67. Huntington, T.C. and Hasan, M.R. 2009. Fish as feed inputs for aquaculture – practices, sustainability and implications: a global synthesis. In M.R. Hasan and M. Halwart (eds). Fish as feed inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 518. Rome, FAO. pp. 1–61

XIII. ANEXOS

ANEXO 1. MÉTODO DE AIA

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

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

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

Principio

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

Soluciones requeridas

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

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

Procesamiento de las muestras

Fósforo total

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

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

Fósforo libre

Pesar 200 mg de muestra y colocar en tubos CORNING® y agregar 10 ml de agua destilada. Dejar en agitación constante durante 12 horas para permitir que las muestras se disuelvan perfectamente y lograr la mayor cantidad posible de ortofosfato. Posteriormente, centrifugar las muestras a 5000 RPM durante 10 minutos y tomar 2 ml de sobrenadante y colocarlos en tubos Eppendorf® para centrifugar nuevamente a 13,000 RPM por 10 minutos más.

A continuación, tomar 1 ml del sobrenadante final obtenido y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua destilada. Tomar ahora 5 ml de la solución madre

obtenida y agregar 0.5 ml de la solución de molibdato-ácido ascórbico y esperar 60 minutos para realizar la lectura.

Determinación

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

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

Cálculos

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

$$\text{Fósforo, g/100 g} = 100 \times [(V2/V1) \times P]/W$$

Dónde:

V1: Volumen de la solución usada en la reacción de color (ml).

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

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

W: Peso de la muestra utilizada (mg).