



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**DIGESTIBILIDAD APARENTE *in vivo* DE MATERIA SECA,
PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS DE INGREDIENTES DE ORIGEN
MARINO Y TERRESTRE. Y SU APLICACIÓN PARA EL ESTUDIO
DE REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES EN JUVENILES DE
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei***

Tesis

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

presenta

Martín Manuel Terrazas Fierro

La Paz, B.C.S., México

Agosto de 2010

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 16 del Mes de Agosto del 2010, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Digestibilidad aparente *in vivo* de materia seca, proteína y aminoácidos de ingredientes de origen marino y terrestre, y su aplicación para el estudio de requerimientos nutricionales en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Presentada por el alumno:

Martín Manuel Terrazas Fierro

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUICULTURA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

 <hr/> DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO DIRECTOR DE TESIS	 <hr/> DR. GERARDO MANISCAL LANDIN CO-TUTOR
 <hr/> DR. HECTOR NOLASCO BOHNA CO-TUTOR	 <hr/> DRA. LUCÍA OCAMPO VICTORIA CO-TUTOR
 <hr/> DR. ELIE SAVA RACOTTA DIMITROV CO-TUTOR	
 <hr/> DRA. ELISA BERRIERE ZARAGOZA, DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO	

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité Tutorial

Dr. Roberto Civera Cerecedo: Director de Tesis

Dr. Gerardo Mariscal Landín: Co-Tutor

Dr. Héctor Nolasco Soria: Co-Tutor

Dra. Lucía Ocampo Victoria: Co-Tutor

Dr. Ilie Racotta Dimitrov: Co-Tutor

Comité revisor de tesis

Dr. Roberto Civera Cerecedo: CIBNOR

Dr. Gerardo Mariscal Landín: INIFAP

Dr. Héctor Nolasco Soria: CIBNOR

Dra. Lucía Ocampo Victoria: CIBNOR

Dr. Ilie Racotta Dimitrov: CIBNOR

Jurado de examen de grado

Dr. Roberto Civera Cerecedo, CIBNOR

Dr. Héctor Nolasco Soria, CIBNOR

Dra. Lucía Ocampo Victoria, CIBNOR

Dr. Ilie Racotta Dimitrov, CIBNOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez, CIBNOR

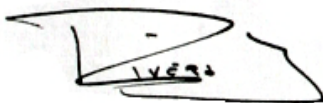
Suplente: Dr. Edilmar Cortés Jacinto, CIBNOR

RESUMEN

Para llevar a cabo la formulación de alimentos balanceados se requiere conocer no sólo la cantidad de proteína cruda, sino también el contenido de aminoácidos (AA) de los ingredientes. Sin embargo, a pesar de que la cuantificación de los AA en las materias primas es importante, ésta información es insuficiente para hacer una adecuada formulación, ya que generalmente la digestibilidad de cada AA es menor a la cantidad analizada. Existe poca información sobre la digestibilidad de la proteína y los AA esenciales de los ingredientes usados en alimentos para camarón en México, y ésta no ha sido utilizada para determinar los niveles óptimos de proteína digerible y metionina en alimentos. El objetivo del presente estudio fue determinar los coeficientes de utilización digestiva aparente *in vivo* de materia seca (DAMS), proteína (DAP) y AA esenciales (DAAA) en 17 ingredientes, para posteriormente, determinar el efecto de los niveles de proteína digerible y metionina total del alimento sobre el crecimiento y la utilización del alimento en juveniles de camarón blanco. Para ello, en la primera parte del trabajo, se evaluaron 9 ingredientes de origen marino: cuatro harinas de pescado, sardina Monterrey entera (HPA), recorte de sardina y otro de distinto fabricante (HPB, HPC) y residuos del fileteado de atún (HPD); harina de desechos de almeja catarina (HDAC) *Argopecten ventricosus*, concentrado proteico de solubles de pescado (CPSP), harina de langostilla (HLAN) *Pleuroncodes planipes*, harina de cabeza de camarón (HCAM), y harina de calamar (HCAL); así como 8 ingredientes de origen terrestre: caseína (CASE), harina de subproductos avícolas (HSPA), harina de subproductos porcícolas (HSPP), harina de trigo (HTRI), harina de sorgo (HSOR), pasta de soya (PSOY), gluten de maíz (GLM) y gluten de trigo (GLT). En los 17 ingredientes evaluados, la DAMS fluctuó entre 44% y 109.2% y la DAP entre 62.7% y 103.1% para la HPC y el GLT, respectivamente. En el grupo de ingredientes de origen marino la mayor variación se encontró en las harinas de pescado con valores de DAMS entre 44% (HPC) y 76.2% (HPA), y de DAP entre 62.7% (HPC) y 84.9% (HPA). El CPSP, la HCAM y la HCAL tuvieron digestibilidades de proteína superiores al 83%, mientras que en la HDAC y en la HLAN fueron cercanas al 85%. En los ingredientes de origen terrestre, la DAMS fluctuó entre 68.2% (HSPP) y 109.2% (GLT), y la DAP entre 69.9% (HSOR) y 103.1% (GLT). En la HSOR se encontró la menor DAP (70%), mientras que la HSPA y la HSPP tuvieron digestibilidades cercanas a 88%. La CASE, la HTRI, la PSOY y el GLT mostraron DAP cercanas al 100%. La digestibilidad de aminoácidos esenciales siguió una tendencia muy similar a la de los valores encontrados para la digestibilidad de proteína. Las harinas de solubles de pescado, cabeza de camarón, calamar, desechos de almeja catarina y de sardina entera (HPA), así como la harina de trigo, pasta de soya, caseína, gluten de trigo y harina de subproductos avícolas, fueron los ingredientes con mejores digestibilidades de proteína (>85%) por lo que se recomiendan para ser usados en la fabricación de alimentos para camarón. Se detectó una gran variabilidad en la DAP y la DAAA entre los ingredientes evaluados, lo cual debe ser considerado en la formulación de alimentos. En la segunda parte del trabajo se realizó un bioensayo de crecimiento con duración de 44 días, donde se evaluaron 20 alimentos que contenían cuatro niveles (18, 23, 28 y 33%) de proteína digerible (PD) con una concentración inicial de 0.25%, 0.35%, 0.45% y 0.55% de metionina, respectivamente. A cada nivel de PD le fue adicionado 0.00%, 0.17%, 0.33%, 0.50% y 0.66% de DL-metionina

cristalina (protegida con carboxi-metil-celulosa). Los dos niveles menores de PD (18% y 23%) rindieron los menores pesos promedio finales (1.31 g y 1.23 g, respectivamente), mientras que con 28% y 33% de PD los pesos promedio finales fueron significativamente mayores (2.48 y 5.02g, respectivamente). La mejor conversión alimenticia (1.93) se obtuvo con el alimento que contenía 33% de PD y 0.33% de DL-metionina adicionada. Los resultados indicaron que no hubo efectos por el nivel de proteína, ni el nivel de metionina en los alimentos con 18% y 23% de PD, mientras que sí se encontraron diferencias entre 28% y 33% de PD, así como un efecto por el nivel de metionina en esos dos grupos de alimentos, donde a mayor nivel de metionina total, mayor fue el crecimiento. El análisis de regresión lineal para el peso final indicó que posiblemente pudiera haber una mayor respuesta de crecimiento en peso con un nivel de metionina mayor al 1.15% y/o un nivel mayor al 33% de proteína digerible, que fueron los niveles máximos evaluados aquí.

Vo. Bo.



Dr. Roberto Civera Cerecedo

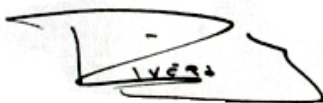
ABSTRACT

To make balanced feed formulations, it is necessary to measure the content of crude protein as well as the amount of amino acids (AA) in the ingredients. Although quantification of AA in the raw materials is important, this information is not enough to make proper formulations, since AA digestibility is generally lower than the amount analyzed. There is little information on protein and essential AA digestibility of the ingredients available in Mexico. Additionally, data regarding optimal levels of digestible protein and methionine in shrimp diets are scanty. This study determined the *in vivo* apparent digestibility of dry matter (DMD), protein (PD), and essential AA (AAD) for 17 ingredients and the effect of digestible protein and methionine dietary levels on growth and use of feed in juvenile white shrimp. In the first part of this study, nine marine ingredients were evaluated: four commercial fish meals (FM) from different sources, batches, or species designated as A, B, C, and D; fish soluble protein concentrate (FSPC); meal from the squid *Loligo gahi* (SM); meal from heads of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (SHM); meal from the red crab *Pleuroncodes planipes* (RCM); and byproduct meal from the Catarina scallop *Argopecten ventricosus* (CSBM). Also, eight agricultural products were tested: casein (CAS), poultry by-product meal (PM), hog by-product meal (HBPM), wheat meal (WM), sorghum meal (SOM), soybean paste (SP), corn gluten (CGL), and wheat gluten (WGL). Of the 17 ingredients that were evaluated, DMD varied from 44% to 109.2% and PD from 62.7% to 103.1% for the FMC and WG, respectively. In the group of marine ingredients, the main variations were found in the fish meals, with values of dry matter digestibility ranging from 44% in FMC to 76.2% in FMA and protein digestibility between 62.7% in FMC and 84.9% in FMA. Protein digestibility in FSPC, SM, and SHM were higher than 83%, while CSBM and RCM were close to 85%. Of the agricultural products, dry matter digestibility varied from 68.2% in HBPM to 109.2% in WGL and protein digestibility from 69.9% in SOM to 103.1% in WGL. The lowest PD was found in SOM (70%), while PM and HBPM had values close to 88%. The CAS, WM, WGL, and SP showed protein digestibility close to 100%. The digestibility of amino acids followed a very similar trend to protein digestibility. Fish soluble protein concentrate, shrimp head meal, squid meal, Catarina scallop byproduct meal and whole sardine meal (FMA), as well as wheat meal, soybean paste, Casein, wheat gluten and poultry by-product meal had the highest protein digestibility (>85%); hence they are recommended for use in shrimp feed. There was a large variation in protein and amino acid digestibility among the ingredients, which should be considered in the formulation of feeds.

In the second part of the study, a 44-day growth trial was conducted to evaluate 20 diets containing four digestible protein (DP) dietary levels (18, 23, 28, and 33%) with initial concentrations of 0.25%, 0.35%, 0.45%, and 0.55% methionine, respectively. In each group of digestible protein levels, crystalline DL-methionine (protected with carboxy-methyl-cellulose) was added at concentrations of 0.00%, 0.17%, 0.33%, 0.50%, and 0.66%, respectively. The two lower levels of digestible proteins (18% and 23%) yielded the lowest final average weights (1.31 g and 1.23 g, respectively). At the 28% and 33% dietary protein levels, the final average weights were significantly higher (2.48 and 5.02 g), respectively. The best feed conversion ratio (1.93) was obtained with the diet containing 33% digestible

protein and 0.33% DL-methionine. No effect of digestible protein or methionine dietary levels on growth was observed in diets containing 18% and 23% digestible protein; however, there were differences at the 28% and 33% digestible protein level. Additionally, the amount of methionine in these two groups of diets affected growth, where the highest amount of total dietary methionine resulted in the greatest growth. Linear regression analysis of final weight indicated that greater growth response could be obtained with digestible protein and/or methionine concentrations higher than 33% and 1.15%, respectively, which were the maximum dietary levels evaluated.

Vo. Bo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Roberto Civera Cerecedo', is written over a horizontal line.

Dr. Roberto Civera Cerecedo

DEDICATORIA

A mi Madre Irma: Quien es la mejor nutrióloga, economista, psicóloga y persona disciplinada que he conocido, como siempre mi Amor, mi Admiración y Respeto, gracias por todo. A toda su familia por ser un ejemplo de amor, lealtad, respeto y honradez, de lo cual buena falta le hacen a este planeta, los amo.

A mi Padre Manuel y a su hermana Patricia: De quienes aprendí a valorar lo que es producir en el campo, y muchos de los trucos que no aparecen en los libros, vaya que se ganaron muchas batallas y se sobrellevaron muchos momentos de preocupación.

A mis hermanas Irma Concepción y Claudia Georgina, a mis hermanos Francisco Alejandro (q.p.d.) y Luis Felipe, simplemente son los mejores que podría desear.

A mis hijos: Marcela Alejandra, María Fernanda y Adrian Octavio, gracias por su paciencia, por soportar mis ausencias y por su apoyo; creo que han entendido bien que todo lo que se busca para mejorar, implica una buena dosis de trabajo, los amo.

A Mony: Por tú amor, apoyo y cariño durante el tiempo en que caminamos juntos, gracias por tú amistad.

A mi Tío Manuel Corral (q.p.d.): Mi primer maestro de zootecnia, sembraste en mí valiosos conocimientos, haz sido el mejor productor de ganado de carne que he conocido (100% de pariciones por muchos años en ganado Hereford y Angus), no en vano los académicos de la Universidad de las Cruces Nuevo México te querían en su equipo. Me enseñaste a utilizar el sentido común para mejorar la producción, a amar el olor de los forrajes y conocer el efecto benéfico de las harinas de origen animal en la producción de leche y carne (los científicos lo hicieron varios años después), estabas en lo correcto y ahora sé el porque de esos efectos. Vaya Tío, tú capacidad pudo vencer muchos obstáculos, estoy seguro de que te fuiste con un doctorado *honoris chamba*.

A Eire: Eres una mujer muy valiente y una lección de vida para mí. Tú inteligencia fuera de lo común, tú cultura, tú preparación y versatilidad, me hacen sentir pequeño, me haz enseñado que tengo mucho que aprender y mejorar en mi trabajo profesional; me encanta que me ganes en todo, es un verdadero placer preguntar y encontrar en ti siempre una respuesta correcta, que admirable y que orgullo, personas con tú nivel le hacen mucha falta a México. Tu afición al telescopio, a los mapas galácticos, a instrumentos antiguos de navegación, la búsqueda de vida extraterrestre (ya me encontraste) con el programa SETI de la Universidad de Berkeley, tus conocimientos avanzados de computación y que hayas encontrado patógenos no usuales en México (de lo macro a lo micro, y yo en medio, que preocupación). Locutora de radio en internet, asidua lectora de libros, conocedora de la música, ecléctica, pragmática y a veces sarcástica ¡bueno!...necesitaría un capítulo completo para ti. Te amo.

A mis compañeros de estudios: Eire, Elio, Miguel, Vanessa, Coy, Jaime, Laura, Alejandra, Alfonso, Ricardo, Dwight, Carlita, Marthita y Carlos, que aventuras en el posgrado y en el Salsipuedes. Vaya que hay talento, faltan más oportunidades.

A los amigos Doctores: Jaime, Angel, Edilmar y Pedro, me terminaron de “echar a perder”.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por distinguirme con la beca de doctorado No. 200615.

A la Universidad Autónoma de Baja California Sur por autorizar mi solicitud para realizar estudios de doctorado.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado de la SEP por su apoyo durante mis estudios.

Al Dr. Eliseo Alcántara y a la empresa Malta Cleyton por financiar parcialmente al proyecto y distinguirnos en el año 2005, con el 2do. Lugar de la segunda Edición del Premio Nacional Malta Cleyton a la Innovación en Nutrición Animal por mi idea de trabajo de tesis.

A los integrantes de mi Comité Tutorial: Dr. Roberto Civera Cerecedo, Dr. Gerardo Mariscal Landín, Dr. Héctor Nolasco Soria, Dra. Lucía Ocampo Victoria y Dr. Ilie Racotta Dimitrov, sus amables consejos y orientación contribuyeron de manera importante en mejorar mi desempeño como estudiante de doctorado y normar mi criterio en mi inicio en el campo de la investigación.

A Ernesto Goytortúa Bores del Laboratorio de Nutrición Acuícola, por capacitarme y apoyarme en las técnicas realizadas en el laboratorio bajo su digno cargo, gracias por tú amistad.

A Sonia Guadalupe Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga del Laboratorio de Análisis Químico Proximal, su apoyo fue más allá de su responsabilidad profesional, gracias por su amistad y compañerismo.

A Sandra de la Paz Reyes del Laboratorio de Nutrición Experimental, quien tuvo siempre una gran disposición para apoyarme y auxiliarme en todo lo necesario durante el desarrollo de los experimentos con camarón, siempre lo hizo como si fuera su propia tesis, mi admiración y respeto para ti.

A Lilia Isabel Ibarra Martínez, René Rodolfo Rebollar Prudente y Daniel Octavio Ceseña Ojeda del Laboratorio de Cromatografía, sin su apoyo el presente trabajo no se hubiera concretado, gracias por su amistad y compañerismo.

A Horacio Sandoval Gómez y a José Manuel Melero Astorga del Laboratorio de Cómputo de Posgrado, por su amabilidad al despejar mis dudas sobre el correcto uso de las herramientas de computó lo cual facilitó nuestro trabajo.

En especial a la M.C. Mariela Camacho Barrón por su apoyo y su dedicación en la capacitación que recibí de su parte para el desarrollo de la técnica de análisis de aminoácidos con el equipo HPLC.

A la Dra. Eliza Serviere Zaragoza Directora de Estudios de Posgrado, Lic. Osvelia Ibarra Morales y Lic. Leticia González Rubio Rivera del Departamento de Control Escolar de Posgrado, y a la Sra. Claudia Elizabeth Olachea León del Departamento de Becas y Apoyo Estudiantil, mi más profundo agradecimiento por su orientación, apoyo y paciencia.

A mis compañeros y amigos Margarita Herrera Andrade y Armando Reyes Becerra, por su valiosa ayuda en el arduo experimento de digestibilidad, sin su apoyo no hubiera sido posible realizarlo.

INDICE

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS.....	¡Error! Marcador no definido.
CONFORMACIÓN DE COMITÉS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABLAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	5
Ingredientes proteicos.....	5
Optimización del uso de la proteína.....	7
Requerimiento de proteína.....	8
Deficiencia de proteína.....	13
Necesidades de aminoácidos.....	15
Proteína ideal.....	17
Digestibilidad in vivo.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	25
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Experimento I: Determinación de la digestibilidad aparente in vivo de proteína y aminoácidos esenciales de 9 ingredientes de origen marino y 8 de origen terrestre.....	29
I.1. Ingredientes y alimentos experimentales.....	29
I.1.1. Ingredientes de origen marino.....	29
I.1.2. Ingredientes de origen terrestre.....	30
I.2. Evaluación química de ingredientes y alimentos experimentales.....	32
I.2.1. Análisis químico proximal.....	32
I.2.2. Energía bruta.....	33
I.2.3. Determinación del perfil de aminoácidos.....	33
I.2.3.1. Hidrólisis ácida.....	34
I.2.3.2. Oxidación de las muestras con ácido perfórmico.....	34
I.2.3.3. Preparación de fases móviles.....	36
I.2.3.4. Derivatización.....	36
I.3. Formulación de alimentos.....	37
I.3.1. Alimento de referencia.....	37
I.3.2. Alimentos experimentales.....	38
I.4. Fabricación de alimentos.....	39
I.4.1. Hidroestabilidad de los alimentos.....	40
I.5. Sistema experimental.....	41
I.6. Organismos.....	42
I.7. Diseño experimental y condiciones de cultivo del ensayo de digestibilidad.....	43
I.7.1. Cuantificación del óxido crómico en alimentos y heces.....	44

I.7.2. Cálculo de los coeficientes de digestibilidad aparente.....	46
I.7.3. Análisis estadísticos.....	47
Experimento II. Determinación del efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y metionina en el alimento sobre el crecimiento y utilización del alimento en juveniles de camarón <i>L. vannamei</i>	48
II.1. Bioensayo de crecimiento.....	48
II.1.1. Organismos.....	48
II.1.2. Alimentos experimentales.....	49
II.1.2.1. Formulación y fabricación de los alimentos.....	49
II.1.2.2. Preparación de la DL-metionina protegida.....	51
II.1.3. Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	51
II.1.4. Criterios de evaluación.....	53
II.1.5. Análisis estadísticos.....	54
RESULTADOS	57
Experimento I: Determinación de la digestibilidad aparente in vivo de proteína y aminoácidos esenciales en 9 ingredientes de origen marino y 8 de origen terrestre.....	57
I.1. Ingredientes de origen marino.....	57
I.1.1. Composición química proximal, energía bruta y aminoácidos contenidos en ingredientes de origen marino.....	57
I.1.1.1. Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y proteína (DAP) de ingredientes de origen marino.....	62
I.1.1.2. Digestibilidad aparente de aminoácidos (DAAA) de ingredientes de origen marino.....	63
I.1.2. Ingredientes de origen terrestre.....	66
I.1.2.1. Composición química proximal, energía bruta y aminoácidos contenidos en los ingredientes de origen terrestre.....	66
I.1.2.2. Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y de proteína (DAP) de ingredientes de origen terrestre.....	71
I.1.2.3. Digestibilidad aparente de aminoácidos (DAAA) de ingredientes de origen terrestre.....	72
Experimento II. Determinación del efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y metionina en el alimento sobre el crecimiento y utilización del alimento en juveniles de camarón <i>L. vannamei</i>	75
II.1. Análisis químico proximal y contenido de energía en los alimentos.....	75
II.2. Bioensayo de crecimiento.....	76
II.2.1. Proteína en el músculo de la cola.....	84
1. Digestibilidad aparente de ingredientes de origen marino y terrestre.....	86
1.1 Composición química y digestibilidad de materia seca y proteína de ingredientes de origen marino.....	86
1.2 Digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes de origen marino.....	91
1.3 Composición química y digestibilidad de materia seca y proteína de ingredientes de origen terrestre.....	99
1.4 Digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes de origen terrestre.....	108
2. Efecto del nivel de proteína digerible y metionina en el alimento sobre el crecimiento del camarón.....	111

2.1 Efecto del nivel de proteína digerible.....	111
2.2 Efecto del nivel de metionina.....	125
CONCLUSIONES	130
RECOMENDACIONES	132
LITERATURA CITADA	133
ANEXOS	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 28% de proteína digerible, sobre el peso final en juveniles de camarón.	81
Figura 2	Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 33% de proteína digerible, sobre el peso final en juveniles de camarón.	81
Figura 3	Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 28% de proteína digerible, sobre el consumo de alimento en juveniles de camarón.	82
Figura 4	Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 33% de proteína digerible, sobre el consumo de alimento en juveniles de camarón. PI = punto de inflexión.	83
Figura 5	Contenido de proteína cruda (g/100 g de materia seca \pm D.E.) en el músculo de la cola de los camarones al final del bioensayo de crecimiento después de haber sido alimentados durante 44 días con alimentos que contenían 18, 23, 28 y 33% de proteína digerible (PD) y diferentes niveles de metionina total (% en base húmeda). Barras con literales distintas representan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.	84

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Crecimiento de camarones en respuesta a distintos niveles de proteína cruda (en base húmeda) en el alimento.	12
Tabla II	Perfil de aminoácidos esenciales recomendado como porcentaje de la proteína en alimentos para camarón.	17
Tabla III	Ingredientes de origen marino evaluados en la prueba de digestibilidad.	30
Tabla IV	Ingredientes de origen terrestre evaluados en la prueba de digestibilidad.	31
Tabla V	Composición (%) de los alimentos de referencia (AR) y de prueba (AP) (g/100g en base húmeda) usados para medir la digestibilidad de ingredientes.	38
Tabla VI	Composición (% en base húmeda) de los alimentos usados en el bioensayo para determinar el efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y metionina en juveniles de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> .	50
Tabla VII	Composición proximal (g/100g de materia seca \pm desviación estándar) y contenido de energía bruta (kcal g ⁻¹) de los ingredientes de origen marino evaluados en el experimento de digestibilidad.	58
Tabla VIII	Perfil de aminoácidos esenciales (g/100g de alimento \pm desviación estándar) en los ingredientes de origen marino utilizados en la prueba de digestibilidad.	60
Tabla IX	Composición química proximal, contenido de energía, aminoácidos esenciales (g/100g materia seca) e hidroestabilidad (%) del alimento de referencia y los alimentos de prueba.	61
Tabla X	Digestibilidad aparente (% \pm desviación estándar) de materia seca (DAMS) y proteína (DAP) en los ingredientes de origen marino.	63
Tabla XI	Digestibilidad aparente de aminoácidos esenciales (% \pm desviación estándar) de ingredientes origen marino para juveniles del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> .	65

Tabla XII	Composición proximal (g/100g de materia seca \pm desviación estándar) y contenido de energía bruta (kcal g ⁻¹) de los ingredientes de origen terrestre evaluados en el experimento de digestibilidad.	62
Tabla XIII	Perfil de aminoácidos esenciales (g/100g de alimento \pm D.E.) de los ingredientes utilizados en la prueba de digestibilidad.	69
Tabla XIV	Composición química proximal, contenido de energía bruta, perfil de aminoácidos esenciales (g/100g materia seca) e hidroestabilidad en el alimento de referencia y los alimentos de prueba en los que se incorporaron los ingredientes de origen terrestre.	70
Tabla XV	Digestibilidad aparente (% \pm desviación estándar) de materia seca (DAMS) y proteína (DAP) de ingredientes de origen terrestre.	72
Tabla XVI	Digestibilidad aparente (% \pm desviación estándar) de los aminoácidos esenciales en los ingredientes.	74
Tabla XVII	Composición química proximal (g/100 g de materia seca, excepto humedad \pm desviación estándar) y contenido de energía bruta de los alimentos empleados en el bioensayo de crecimiento.	76
Tabla XVIII	Peso final (PF), consumo aparente de alimento (CAA), conversión alimenticia (CA), eficiencia proteica (EP) y supervivencia (SUP) de los camarones que recibieron los alimentos experimentales.	78
Tabla XIX	Comparación del perfil de aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína) en tejidos y alimentos de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .	124
Tabla XX	Respuesta en peso a la metionina cristalina sin proteger incorporada en el alimento (base húmeda) en juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i> en distintos bioensayos.	127
Tabla XXI	Claves del laboratorio de Nutrición Acuícola usadas en los ingredientes de origen marino evaluados en la prueba de digestibilidad.	164
Tabla XXII	Claves del laboratorio de Nutrición Acuícola usadas en los ingredientes de origen terrestre evaluados en la prueba de digestibilidad.	165

Tabla XXIII	Concentración de nitratos, nitritos y amonio del agua durante el bioensayo de crecimiento.	166
-------------	--	-----

INTRODUCCIÓN

El proceso de formulación de alimentos balanceados para camarón ha sido objeto de cambios paulatinos en los criterios empleados para cubrir las necesidades de proteína, pasando de un método relativamente sencillo, que buscaba cubrir únicamente una cantidad de proteína cruda (Tacon, 2002), a una técnica más desarrollada con la finalidad de optimizar el uso de la proteína y de mejorar su calidad al considerar en la formulación el contenido de aminoácidos esenciales (Fox *et al.*, 2006; Siccardi III *et al.*, 2006). Éstos cambios se han realizado en virtud de que si se formula para cubrir únicamente la concentración total de proteína, generalmente se induce un exceso en la cantidad de otros aminoácidos en el alimento (Alam *et al.*, 2004), que además de ser una forma poco económica de alimentar, también representa un vector de contaminación para el medio ambiente por la cantidad de proteína que se desperdicia, lo que contraviene las prácticas de sustentabilidad que se recomiendan en la acuicultura moderna (Burford y Williams, 2001; Primavera, 2005).

El rubro de la alimentación representa el mayor egreso económico en la operación de las granjas para camarón, siendo los ingredientes proteicos los más caros que se emplean en la formulación (Lawrence y Lee, 1997). Un factor importante que se debe considerar en la calidad de los ingredientes proteicos, es su contenido de aminoácidos esenciales (Wilson, 2002) ya que a partir de esa información es posible avanzar hacia la creación de fórmulas que permitan cubrir con mayor precisión el perfil de aminoácidos esenciales recomendado para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Tacon *et al.*, 2002). El generar en los

alimentos un perfil de aminoácidos más cercano a las necesidades del animal, ha demostrado ser una herramienta que tiene un impacto positivo al reducir la emisión de compuestos nitrogenados al medio ambiente y los costos de alimentación (Kerr, 1995).

La importancia de las proteínas como nutrimentos en el alimento del camarón radica en que son esenciales para la síntesis de enzimas, hormonas y hemocianina, constituyen el sustento del sistema inmune, participan en la construcción de tejidos, su reparación y mantenimiento, siendo además en caso necesario una fuente importante de energía catabólica para el camarón (Pascual *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2009). Cuando se logra una mayor semejanza entre el perfil de los aminoácidos esenciales de la proteína en el alimento con el perfil de los aminoácidos requeridos por el camarón, mayor será su valor nutrimental y utilización; por el hecho de que la síntesis óptima de proteína sólo se realiza cuando todos los aminoácidos están presentes simultáneamente para la síntesis de tejidos, de lo contrario se induce su catabolismo, con una menor retención de nitrógeno y una disminución en la tasa de crecimiento (Bonn *et al.*, 1991; Kerr, 1995; Mente *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2009).

Al respecto, se han realizado esfuerzos enfocados en dar a conocer las necesidades de algunos de los aminoácidos esenciales (Alam *et al.*, 2004, 2005; Millamena *et al.*, 1996, 1997, 1998, 1999) con la idea de avanzar hacia la formulación sustentada en la calidad de la proteína, al considerar una concentración de aminoácidos más cercana a la requerida por el camarón blanco *L. vannamei* (Tacon *et al.*, 2002).

La determinación de la concentración de proteína y aminoácidos en los ingredientes como paso inicial es útil pero insuficiente, ya que la fracción digerible de esos nutrimentos no se detecta con las técnicas analíticas de laboratorio; siendo generalmente, la porción digerible menor a la concentración total encontrada en los ingredientes (Parsons, 1991; Terrazas *et al.*, 2005). La combinación de la intensidad de los procesos de digestión y absorción es conocida como digestibilidad, y ésta relacionada íntimamente con el valor nutritivo de los ingredientes alimenticios (Akiyama *et al.*, 1989).

El estudio de los requerimientos nutricionales de la proteína y los aminoácidos en base digerible es importante para optimizar la cantidad y calidad de la proteína en los alimentos balanceados, ya que permite ofrecer un perfil de aminoácidos más parecido al requerido para el crecimiento óptimo, con una mayor retención de nitrógeno en los organismos (Baker, 1997), además de ser un elemento clave para mejorar la formulación a menor costo (NRC, 1993; Cromwell, 1998). Al determinar la digestibilidad *in vivo* de la proteína y de los aminoácidos en distintos ingredientes, se genera información importante que permite avanzar en la formulación empleando el criterio de la proteína ideal. Con esta práctica se obtiene una mejora sustancial en la calidad de los alimentos balanceados, ya que existe una relación inversa entre el grado de digestibilidad y la excreción al medio de cultivo de las fracciones de los nutrimentos no utilizados por el camarón (Tacon, 2002).

Actualmente se han generado una gran cantidad de trabajos experimentales desarrollados bajo distintas condiciones de manejo del camarón, con la idea de optimizar los niveles de proteína, pero no existe información publicada sobre cuál es el nivel óptimo de proteína

digerible y tampoco se ha determinado el nivel que corresponde a la optimización de la concentración de metionina, ni en base total (Forster y Dominy, 2006), ni en base digerible, en alimentos para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Un aminoácido limitante es aquel que por su concentración en un ingrediente o combinación de ingredientes, se encuentra en un nivel bajo con respecto a la cantidad requerida por un animal en particular. El que un aminoácido sea limitante es una característica inherente a la especie, la etapa de crecimiento y el estado fisiológico en que se encuentra la misma (Cuarón, 1991).

La metionina ha sido considerada como el primer aminoácido limitante en los alimentos para camarón (Forster y Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2009) de ahí la importancia de conocer más sobre su nivel óptimo de inclusión en la formulación de alimentos balanceados para este crustáceo.

En el presente trabajo de investigación se determinó la digestibilidad *in vivo* de materia seca, proteína y aminoácidos esenciales de 17 ingredientes alimenticios, de los cuales 15 son usados en la industria de alimentos balanceados a nivel comercial y 2 ingredientes que tienen potencial de explotación en la Península de Baja California (harinas de langostilla y de desechos de almeja catarina). Asimismo, se inició el estudio de la determinación del nivel óptimo de proteína y metionina digeribles para juveniles de camarón blanco, y con

ello sentar las bases para el desarrollo de una nueva generación de alimentos balanceados más eficientes.

ANTECEDENTES

Ingredientes proteicos

Convencionalmente la harina de pescado es la principal fuente de proteína en alimentos para camarón, empleando el 60% de la producción mundial (6 millones de toneladas) para ese fin (FAO, 2008). Sin embargo, dada la escasez, alto costo y variabilidad nutrimental de ese recurso, los nutriólogos están considerando para formular alimentos el uso de fuentes alternas de proteína en sustitución total o parcial de la harina de pescado (Fox *et al.*, 2004; Villarreal *et al.*, 2006). El uso de distintos ingredientes proteicos en la formulación de alimentos balanceados permite además la complementación mutua entre los perfiles de aminoácidos contenidos en los ingredientes, rindiendo alimentos con un mejor equilibrio de aminoácidos y potencialmente una mayor retención de nitrógeno en los tejidos del animal (Cuarón, 1991).

Las fuentes alternas de proteína representan una oportunidad para aumentar la eficiencia en el uso de los recursos para alimentación y ofrecen interesantes posibilidades para incrementar la rentabilidad, dando también mayor flexibilidad al proceso de formulación.

Desde un punto de vista comercial, es deseable que los ingredientes proteicos posean una concentración de proteína y aminoácidos con poca variabilidad entre distintos lotes de un mismo ingrediente, y que además estén disponibles en el mercado a un precio accesible. Tal

es el caso del frijol soya y sus subproductos, empleados ampliamente en la producción comercial de alimentos balanceados para diversas especies animales (Akiyama, 1990; Paripatananont *et al.*, 2001; CANACINTRA, 2004). De ahí que el frijol, y en particular la pasta de soya, sea una excelente opción como fuente de proteína al sustituir hasta el 42% de la harina de pescado en alimentos prácticos para camarón blanco (Lim y Dominy, 1990). Sin embargo, para considerar su incorporación a los alimentos, es importante mencionar que la proteína de la pasta de soya es deficiente en metionina, por lo que es deseable la adición de metionina cristalina como suplemento para obtener un beneficio real del resto de los aminoácidos (Forster y Dominy, 2006).

La tendencia actual de sustituir a la harina de pescado como fuente de proteína convencional por otros ingredientes proteicos alternos ha sido posible gracias a que el camarón blanco es un crustáceo omnívoro (Cuzon *et al.*, 2004). Al respecto, existe amplia información sobre la evaluación de distintos ingredientes proteicos de origen vegetal y animal, con resultados que indican que es factible reducir la cantidad de harina de pescado en los alimentos para camarón (Lim y Dominy, 1990; Civera *et al.*, 1998; Yu, 2004; Fox *et al.*, 2004).

Se han evaluado con éxito los ingredientes proteicos alternos para reemplazar parcialmente a la harina de pescado en alimentos para camarón, ejemplos de ello son la harina de langostilla (Goytortúa-Bores *et al.*, 2006), las harinas de carne elaboradas con subproductos del rastro de aves (Cruz-Suárez y Hernández, 2004) y cerdos (Hernández *et al.*, 2008), harina de carne y hueso (Yu, 2004). También se ha evaluado la potencial sustitución de la

harina de pescado usando soya extrudida en combinación con harina de subproductos de ave (Samocha *et al.*, 2004); usando también a la soya integral y productos de ese frijol como el concentrado proteico de soya, aislado proteico de soya y la pasta de soya convencional (Cruz-Suárez *et al.*, 2009); también han sido evaluados con éxito después de usar distintos métodos para su procesamiento al frijol yorimón (Rivas-Vega *et al.*, 2006) y la pasta de cártamo (Galicia-González *et al.*, 2010); así como otras fuentes proteicas vegetales como el gluten de trigo (Bortone *et al.*, 1995) y la pasta de canola (Lim *et al.*, 1997).

En un estudio realizado para comparar distintos niveles de proteína usados en alimentos comerciales para distintas especies de camarón, se sugirió la posibilidad de que dados los hábitos alimenticios del camarón blanco, es factible reducir el nivel de proteína en sus alimentos balanceados (Tacon y Akiyama, 1997). En virtud de que ya se formulan alimentos para camarón blanco con menor cantidad de proteína cuando son manejados en estanquería a cielo abierto (siempre y cuando la densidad de siembra y/o la productividad natural no sean limitantes), es posible incorporar en la formulación de sus alimentos a ingredientes proteicos de origen vegetal (Cuzon *et al.*, 2004), ya que en general esos ingredientes contienen una menor cantidad de aminoácidos esenciales cuando se les compara con ingredientes proteicos de origen animal (Mariscal *et al.*, 1998).

Optimización del uso de la proteína

El desecho de nitrógeno en las granjas camaroneras es uno de los principales factores de contaminación que impacta negativamente al ambiente (Montoya *et al.*, 2002), por lo

anterior el control de esas emisiones es regulado en distintos países (Tacon y Forster, 2003). Dependiendo de su concentración, los residuos que contienen nitrógeno pueden ser un elemento tóxico para los organismos en cultivo (Casillas Hernández *et al.*, 2006), además de representar una pérdida económica que repercute en la rentabilidad del negocio de cultivo del camarón, ya que aproximadamente un 90% del nitrógeno que entra a los estanques proviene de las proteínas del alimento (Jackson *et al.*, 2003).

La eficiencia del uso de la proteína por el camarón es un hecho preocupante, porque del total de la proteína consumida en el alimento por ese crustáceo, sólo se retiene en los tejidos del camarón un 22% de la misma en algunos casos (Divakaran, 2006). Además, se ha reportado que sólo el 15% de la proteína cruda consumida en el alimento balanceado por el camarón puede llegar al consumo humano, cuando se toma en cuenta para el cálculo únicamente a la proteína contenida en el músculo de la cola del camarón. De ahí la importancia de usar cantidades de proteína más cercanas a las necesidades requeridas para el cultivo del camarón (Friman, 2001), para definir con precisión los requerimientos de metionina, los cuales pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo y de la fuente de proteína.

Requerimiento de proteína

Las demandas de proteína alimenticia dependen en gran medida de la densidad de siembra de los camarones, y por ende, de la productividad primaria (zooplancton y fitoplancton) como ha sido demostrado en distintos trabajos experimentales (Martínez-Cordova *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002).

El principal objetivo en la formulación de alimentos balanceados es lograr aproximar el perfil de la combinación de nutrimentos de los distintos ingredientes alimenticios con los requerimientos nutrimentales del animal. En el 2002, Tacon señaló que se debe incrementar la eficiencia en el uso de los nutrimentos en los alimentos balanceados para camarón, reduciendo las pérdidas de los mismos por medio de una mejor digestión de los nutrimentos, minimizando su desperdicio por la desintegración parcial de los pellets del alimento en el agua, o bien, evitar la formulación con una concentración excesiva de nutrimentos.

En la alimentación del camarón, se ha optado por formular alimentos con base en el contenido total de proteína cruda de los ingredientes, al ser este el nutrimento más importante en los alimentos comerciales, con una concentración de proteína que fluctúa entre 30 y 55% (Civera *et al.*, 1998).

Desde hace tiempo, se planteó la posibilidad de reducir el nivel de proteína en los alimentos balanceados para camarón mediante el conocimiento más exacto de las necesidades nutrimentales de este crustáceo y por el uso de una mayor variedad de ingredientes alimenticios (Tacon y Akiyama, 1997). Akiyama (1993) menciona que es factible reducir los costos de alimentación al evitar concentraciones elevadas de distintos nutrimentos como el fósforo y las vitaminas, y de que la proteína en alimentos para el camarón *Penaeus monodon* cultivado en condiciones semi-intensivas, se puede reducir a un 30% de proteína. En años posteriores, se generaron una serie de trabajos experimentales con la idea de

optimizar los niveles de proteína cruda en alimentos para juveniles de camarón de distintas especies.

En el caso del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se han realizado distintos experimentos para comparar el efecto de alimentos con diferentes concentraciones de proteína. Por ejemplo, Velasco *et al.* (2000) realizaron un experimento para evaluar en laboratorio la respuesta en crecimiento de larvas de camarón (entre 0.9 y 1.0 mg de peso) alimentadas con distintos niveles de proteína y lípidos, estableciendo que la concentración óptima de proteína para una mejor ganancia de peso, fluctuaba entre el 21.4 y el 24.5%, lo que dependía de su combinación con una distinta concentración de lípidos empleada en el alimento.

Por su parte, McIntosh *et al.* (2001) utilizaron alimentos con 21% y 31% de proteína para juveniles de camarón blanco con un peso inicial de 1.69 g, y encontraron que un nivel de 31% de proteína en el alimento rindió una ganancia de peso adicional de 22% en los camarones, sin encontrar diferencias entre ambos tratamientos en lo referente a compuestos nitrogenados disueltos en el agua (amonio, nitritos y nitratos), ni en la concentración de fósforo total.

Otros autores realizaron distintos bioensayos. Durante ocho semanas emplearon estaques con fondo de tierra que fueron fertilizados (diez días antes de iniciar los experimentos) con urea y sulfato de amonio; en uno de ellos evaluaron el rendimiento productivo de post-larvas de camarón alimentadas con un alimento conteniendo 40% de proteína cruda contra otro de 25%, donde se encontró que no se presentaron diferencias entre los alimentos

evaluados en términos de la biomasa ganada, la conversión de alimento y la supervivencia de los camarones al final de sus experimentos. Ellos recomendaron el nivel más bajo de proteína como el apropiado para el cultivo de ese crustáceo. El éxito de la reducción de la proteína se atribuyó a la productividad primaria (microorganismos) que contribuyó a la ingesta de proteica total bajo las condiciones de manejo antes señaladas (Martínez-Córdova *et al.*, 2002).

En otro experimento desarrollado a nivel laboratorio (Kai *et al.*, 2003), se evaluaron distintos niveles de proteína en el alimento combinados con condiciones de salinidad baja y alta empleando para ello a juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con peso promedio inicial de 0.011g, donde se encontró que los niveles óptimos de proteína en los alimentos eran de 26.7% y 33% para niveles de salinidad bajos y altos, respectivamente.

Tabla I. Crecimiento de camarones en respuesta a distintos niveles de proteína cruda (en base húmeda) en el alimento.

Especie	Condiciones		Niveles de PC (%)	Pesos (g)		Tiempo (d)	Referencia
	Lab	Ext		Inicial	Final		
<i>L. vannamei</i>		**	21, 21+bacterias SD	1.69	12.2 y 11.7	94	McIntosh <i>et al.</i> (2000)
“”	**		21, 31*	1.69	14.0	94	McIntosh <i>et al.</i> (2001)
“”	**		27, 33, 38, 44*	0.28	1.8	30	Rosas <i>et al.</i> (2001)
<i>L. setiferus</i>	**		27, 33, 38, 44*	0.27	0.97	30	Rosas <i>et al.</i> (2001)
<i>L. vannamei</i>	**		16, 32*	1.7	6.18a	28	Kureshy y Davis (2002)
“”	**		32*, 48	1.3	5.44b	28	Kureshy y Davis (2002)
“”		**	25 y 40 NS	postlarvas	12.0 y 12.9	56	Martínez-Córdova <i>et al.</i> (2002)
<i>P. monodon</i>		**	30, 35, 40*	3.1	14.6	56	Burford <i>et al.</i> (2004)
<i>L. vannamei</i>	**		25, 30, 35, 40 SD	1.96	3.9	25	Gómez-Jiménez <i>et al.</i> (2005)
“”	**		25, 30, 35, 40 SD	0.68	2.78	28	González-Félix <i>et al.</i> (2007)
“”	**		25, 30, 35, 40 SD	0.35 - 0.36	3.40	32	Pérez-Velázquez <i>et al.</i> (2007)
“”	**		30, 34*, 38, 42	0.09	10.24	70	Hu <i>et al.</i> (2008)
“”	**		25 y 30 SD	0.35 y 0.36	1.96 y 2.09	28	Pérez-Velázquez <i>et al.</i> (2008)
“”	**		35 y 40 SD	0.35 y 0.36	1.13 y 1.21	21	Pérez-Velázquez <i>et al.</i> (2008)
“”	**		35*, 38,40, 41	0.36	5.95	70	Huai <i>et al.</i> (2010)

** Experimento desarrollado en laboratorio (Lab) o en exterior (Ext). PC = proteína cruda SD = sin diferencias. * Nivel de proteína con mejor respuesta. a, b = alimento restringido al 25% y 30% de la biomasa por día.

En la Tabla I se muestran algunos de los niveles óptimos de proteína recomendados por distintos autores.

Deficiencia de proteína

La composición proximal del organismo del camarón constituida de un 75% de agua y un 25% de materia seca, del total de la materia seca el 65% es proteína, y de ésta el 68% de la proteína corporal se encuentra en el músculo de la cola (Divakaran, 2006); en las especies de camarones peneidos la proteína en base húmeda representa el 16% de la masa corporal (Cuzon *et al.*, 2004).

En el caso del camarón, la proteína constituye una reserva energética que puede ser utilizada en condiciones de carencia de energía o durante períodos de ayuno, y el nivel de proteína en el alimento es el principal factor que puede modular el uso de la energía (Rosas *et al.*, 2002); al respecto, Pascual *et al.* (2006) encontraron que camarones alimentados con 5% de proteína antes de un período de ayuno, tanto la proteína corporal como los lípidos fueron utilizados como principal fuente de energía durante 7 días de ayuno, mientras que camarones alimentados con 40% de proteína (con el mismo período de ayuno) las reservas de lípidos fueron utilizadas para la síntesis de glucógeno y de glucosa, incrementado la concentración del primero en la glándula digestiva y de la segunda en la sangre.

Una deficiencia proteica en el alimento es indeseable desde el punto de vista comercial, sin embargo se pueden inducir deficiencias involuntarias de proteína (aminoácidos) debido a

varios factores (Cuzon *et al.*, 2004): digestión incompleta, presencia de inhibidores y daños en la propia proteína.

De igual forma, distintos grados de deficiencia se pueden provocar por un desequilibrio entre aminoácidos contenidos en el alimento (Baker, 2005) y por ineficiencias metabólicas (recambio de proteína) inducidas por el perfil de aminoácidos contenidos en los distintos ingredientes alimenticios (Mente *et al.*, 2002).

La proteína es el componente principal de la hemolinfa, y se ha demostrado que una deficiencia proteica en el alimento repercute de manera directa en la concentración del nutrimento en ese fluido corporal (Pascual *et al.*, 2006). Lo anterior es importante en virtud de que la hemocianina contenida en la hemolinfa es también un reservorio de proteína para el camarón y juega un papel en el control de la presión osmótica dependiendo de las condiciones de salinidad en el agua, actuando como una molécula adaptativa de acuerdo a los cambios ambientales (Cuzon *et al.*, 2004)

Aparentemente, lo que podría considerarse como una deficiencia, ya que una reducción del 36 al 24% en el nivel de proteína en el alimento (sin la suplementación de aminoácidos cristalinos), no repercutió negativamente en el sistema inmune del camarón *L. vannamei*, en organismos alimentados con 36% de proteína durante 50 días y posteriormente con distintos niveles del nutrimento (32, 28 y 24%) por 50 días más, en experimentos desarrollados en estanques de 50 m² a cielo abierto con una densidad de 100 organismos por m² (Yaemsooksawat *et al.*, 2009).

Necesidades de aminoácidos

Se han realizado distintos experimentos con la finalidad de dilucidar las necesidades de aminoácidos en alimentos para postlarvas (PL20) del camarón *Penaeus monodon* con un peso entre los 20 y 21 mg, ante distintos niveles de aminoácidos cristalinos protegidos. Uno de ellos (Millamena *et al.*, 1996) se realizó para determinar el requerimiento de metionina, encontrándose que la necesidad de ese aminoácido expresada como porcentaje del alimento era de 0.89%. La necesidad de treonina se estableció más tarde (Millamena *et al.*, 1997), siendo del 1.4% del alimento. En 1998, Millamena *et al.* evaluaron el desempeño productivo del mismo camarón para establecer los requerimientos de lisina y arginina, donde se encontró que la concentración, óptima de los aminoácidos como porcentaje del alimento, era de 2.08 y 1.85%, respectivamente. En otro trabajo experimental (Millamena *et al.*, 1999) determinaron las concentraciones óptimas para los aminoácidos histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina y triptófano, las cuales fueron de 1.01, 1.7, 1.4 y 0.5, respectivamente.

En el caso del camarón kuruma *Marsupenaeus japonicus* (Alam *et al.*, 2004), se estableció que el requerimiento de arginina era de 2.66%, empleando juveniles de 0.22 g de peso bajo condiciones de confinamiento en laboratorio. Por su parte Alam *et al.* (2005) suplementaron dos aminoácidos esenciales para el crecimiento del camarón, usando lisina y metionina protegidos en alimentos para camarón japonés (*Marsupenaeus japonicus*) demostrándose que, al mejorar la calidad de la proteína del alimento, en términos de estos dos aminoácidos es factible inducir un mayor crecimiento en los camarones.

En lo que corresponde al camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se evaluó el requerimiento de lisina (Fox *et al.*, 1995) en laboratorio, usando un alimento con 35% de proteína y empleando gluten de trigo o lisina cristalina como fuentes de lisina, donde se concluyó que el requerimiento aparente de la misma era de 1.57% y 1.82%, respectivamente.

Recientemente (Huai *et al.*, 2009), bajo condiciones de baja salinidad, se determinó que el nivel óptimo de treonina en el alimento para camarones (*Litopenaeus vannamei*) con un peso de 0.48 g fue de 1.36% del alimento, con el cual se obtuvieron mejores ganancias en peso y una mayor concentración de proteína en la hemolinfa.

Respecto a la metionina, Akiyama y Dominy (1990) publicaron recomendaciones de los distintos aminoácidos en los alimentos para camarón, donde establecieron que el óptimo de metionina para todas las especies del crustáceos debería de ser de 0.84% que equivale en promedio al 2.4% de la proteína cruda contenida en el alimento.

En la Tabla II se muestran las recomendaciones de aminoácidos esenciales en alimentos para el camarón *Penaeus monodon* y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de acuerdo a lo estudiado por distintos autores.

Tabla II. Perfil de aminoácidos esenciales recomendado como porcentaje de la proteína en alimentos para camarón.

	<i>Penaeus monodon</i>		<i>Litopenaeus vannamei</i>		
	Millamena <i>et al.</i> , 1999	Cuzon <i>et al.</i> , 2004a	Akiyama <i>et al.</i> 1991	Forster <i>et al.</i> , 2002	Tacon <i>et al.</i> , 2002
Lisina	7.50	5.20	5.30	4.84	5.35
Histidina	2.45	2.20	2.10	1.62	2.16
Arginina	7.90	5.30	5.80	6.10	9.70
Treonina	3.90	3.50	3.60	2.52	4.00
Metionina	2.50	2.40	2.40	—	2.13
Met + Cis	—	—	3.60	2.64	—
Fenilalanina	4.15	3.70	4.00	—	4.97
Fen + Tir	—	—	7.10	5.39	—
Isoleucina	4.40	2.70	3.40	2.65	4.13
Leucina	7.28	4.30	5.40	4.69	7.13
Valina	5.10	3.40	4.00	3.10	4.57

Proteína ideal

Al formular raciones solo con el uso de proteínas naturales contenidas en los ingredientes, se utiliza como único criterio el cubrir la necesidad del primer aminoácido limitante, lo que normalmente genera un exceso de muchos de los aminoácidos contenidos en la mezcla de ingredientes y con esto un exceso en la concentración total de la proteína en el alimento (Kerr, 1994).

En el caso de los animales terrestres, los primeros alimentos balanceados se formularon, con criterios que consideraban la concentración total de proteína en los alimentos

(Fernández, 1996), en vez de formular para mejorar al perfil de los aminoácidos, meta hacia la que se pudo avanzar con el uso de aminoácidos cristalinos que se ofertan comercialmente; esto ocurrió primero con el uso de la metionina (González y Pesti, 1994); y posteriormente con la lisina y la treonina cristalinas (Cuarón, 1993).

Sin embargo, a pesar de existir una oferta comercial de aminoácidos cristalinos se continuó por varios años más con métodos de formulación sustentados en requerimientos de aminoácidos totales, lo que a pesar de ser una forma de alimentación más acertada, representaba una metodología con la que se inducían todavía niveles elevados de varios aminoácidos en los alimentos balanceados (Southern, 1991). Ante una oferta comercial de varios aminoácidos esenciales en forma cristalina para la industria de alimentos balanceados, en la acuicultura existe el inconveniente de que los aminoácidos suplementados no rinden un efecto totalmente benéfico ya que existen importantes mermas por su lixiviación desde el alimento hacia el agua (Lim, 1993).

La primera propuesta sobre un perfil “ideal” de aminoácidos que dio origen a la concepción de la proteína ideal fue hecha por Mitchell (1964) con el objeto de optimizar al máximo el uso de la proteína en un alimento, en términos de hacer más eficiente la retención y minimizar la excreción de nitrógeno metabólico por el animal. En sus inicios, ese concepto estuvo sustentado en bases teóricas con pocas posibilidades de un sentido práctico en virtud del elevado costo de las fuentes cristalinas de aminoácidos.

Desde un punto de vista teórico, la proteína ideal sería aquella que presente en su perfil un balance exacto de aminoácidos esenciales para cubrir el requerimiento de cada uno de ellos sin deficiencias ni excesos, logrando con esto la mayor retención de nitrógeno en el organismo, ya que se considera para la formulación la fracción de cada aminoácido que realmente es utilizada en los procesos fisiológicos del animal (Friman, 2001).

La formulación a proteína ideal rompe con la formulación convencional de aminoácidos totales, en la cual se determina el nivel óptimo de incorporación de un sólo aminoácido a la vez mediante experimentos de dosis respuesta, en donde el resto de los aminoácidos en el alimento permanecen en niveles fijos, con excepción del aminoácido a evaluar, del cual se ofrecían cantidades equidistantes (titulación) hasta lograr la mejor respuesta de una de las características productivas del animal (por ejemplo: ganancia de peso o eficiencia alimenticia).

Cuarón (1991) señaló que, la metodología antes mencionada infringe lo sugerido por Mitchell, quien recomendó un incremento o decremento uniforme en el nivel de todos los aminoácidos (molde o plantilla) con respecto a la cantidad del aminoácido a evaluar, teniendo siempre una proporción constante en la concentración de cada uno de los aminoácidos. Este criterio representa el fundamento actual para la formulación a un perfil ideal de aminoácidos.

En la actualidad, la aplicación práctica de la formulación a proteína ideal para acuicultura esta limitada ya que los nutriólogos no cuentan con datos publicados referentes a

requerimientos de los aminoácidos esenciales en base total y ni tampoco en base digerible para la formulación de alimentos para camarón.

Por otra parte, para optimizar el nivel de proteína en los alimentos es importante identificar qué aminoácidos pueden estar deficientes (limitantes) en los ingredientes alimenticios. El que un aminoácido sea limitante depende de cada especie animal en particular, de cada etapa de crecimiento de la misma, y del perfil de los aminoácidos contenidos en cada ingrediente o combinación de ingredientes (Cuarón, 1991). Se ha determinado que alimentos con bajo contenido de harina de pescado para el camarón *Marsupenaeus japonicus*, los aminoácidos lisina y arginina están a niveles marginales (Alam *et al.*, 2004a); donde es más crítico el nivel de metionina (Vázquez-Añón y Riesen, 2004). Por otro lado, se ha establecido que en alimentos para juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, basadas en la proteína del gluten de trigo los aminoácidos limitantes son la lisina, la arginina y la metionina (Fox *et al.*, 1995).

Sin embargo, para definir con exactitud el orden de limitancia de los aminoácidos en los alimentos para camarón, es necesario conocer el requerimiento de cada uno de ellos, pero en particular de aquellos que potencialmente pueden estar presentes en niveles críticos en los alimentos. Dada la tendencia actual de utilizar los productos de soya en la fabricación de alimentos para camarón, es posible que la metionina siga siendo considerada como el primer aminoácido limitante en los alimentos para el camarón blanco (Forster y Dominy, 2006; Cruz- Suárez *et al.*, 2009).

Digestibilidad *in vivo*

El proceso digestivo está inmerso en un conjunto de fenómenos cuyo objetivo es proporcionar nutrimentos al animal; este conjunto está compuesto por la reducción del tamaño de partícula del alimento, la secreción de enzimas y la hidrólisis de macromoléculas. La combinación de los procesos de digestión y absorción es conocida como digestibilidad *in vivo* (Low, 1980), la cual se define como coeficiente de digestibilidad aparente (CUDA) en el presente trabajo , y se relaciona íntimamente con el valor nutritivo de los ingredientes alimenticios empleados en la formulación y fabricación de alimentos balanceados.

Se asume que la digestibilidad *in vivo* es la proporción de un nutrimento consumido que ya no aparece en las heces. Sin embargo, la digestibilidad medida así se considera aparente, ya que no toma en cuenta las pérdidas de material endógeno y en el caso particular de la acuicultura se enfrentan otras complicaciones en la metodología al medir la digestibilidad, ya que la digestibilidad puede estar sujeta a errores por la lixiviación del alimento en el agua, lo cual ya ha sido planteado en el caso de los aminoácidos (Cruz- Suárez *et al.*, 2009). Puede resultar complicado colectar la totalidad de las heces fecales, por lo que es necesario emplear un marcador inerte para medir la digestibilidad; dado que únicamente se realiza la cuantificación de los nutrimentos presentes en las heces sin considerar lo excretado en la orina, se puede generar una sobreestimación adicional en el resultado de la misma (Sibbald, 1987) como puede ocurrir en las proteínas de ingredientes sobre calentados durante su fabricación.

A diferencia de la digestibilidad aparente, la digestibilidad verdadera mide con mayor precisión la porción de alimento que realmente es absorbida y removida del tracto digestivo, hacia el torrente sanguíneo o a las células de reserva nutritiva (glándula digestiva o hepatopáncreas). Por lo anterior es importante considerar que en las mediciones para determinar la calidad proteica de materias primas, en particular cuando se trata de hacer evaluaciones de ingredientes procesados térmicamente (en general ingredientes de origen animal), se debe tomar en cuenta que una parte de los aminoácidos en los ingredientes podrían estar dañados por efecto del calor (reacción de Maillard), pero en ocasiones cuando se presenta un daño térmico menos severo (en etapas tempranas de la reacción) una parte de esos nutrimentos que han sido expuestos al calor (compuestos Amadori) puede ser digerida y pasar al torrente sanguíneo (Fernández, 1996).

A pesar de que los aminoácidos “dañados” por el calor logran llegar al torrente sanguíneo, estos no pueden ser empleados por el organismo para una función en particular, por lo que este tipo fracción proteica “digerible” no se encuentra disponible para la actividad celular, por ello estos aminoácidos deben ser cuantificados en la orina en los experimentos que se pretenda determinar su disponibilidad (Sibbald, 1987; Fernández, 1996), de lo contrario, se obtienen resultados incorrectos que sobrestiman los coeficientes de digestibilidad verdadera de aminoácidos en los ingredientes; el caso de la lisina es particularmente importante dado que ese aminoácido es altamente sensible al calor, teniendo altas posibilidades de estar involucrado en la reacción de Maillard (Friedman, 1992).

La digestibilidad de un nutrimento en particular se mide por diferencia entre su concentración en el alimento consumido con respecto al residuo del mismo que aparece en la materia fecal. No obstante, para realizar determinaciones de digestibilidad de las proteínas o aminoácidos se debe distinguir qué porción del material que acompaña a las heces no constituye parte del alimento *per se*, ya que existe una cantidad considerable de secreciones (endógenas) del tracto digestivo que contienen proteína, dentro del cual podemos encontrar a las enzimas digestivas extracelulares, células de descamación del epitelio de la mucosa intestinal, microorganismos que habitan el tubo digestivo (Low, 1980) y la membrana peritrófica que envuelve a las heces del camarón, la cual por ejemplo contiene alanina (Akiyama *et al.*, 1989).

Se ha realizado una distinción más puntual entre el material presente en el tubo digestivo, ya que se han clasificado como componentes metabólicos fecales a los residuos biliares (secreciones emulsificantes en el camarón), secreciones enzimáticas, células de descamación y moco, es decir el material que proviene del organismo del animal, así como fracción endógena fecal constituida por los microorganismos y las secreciones propias de los mismos que habitan en el tracto digestivo (Sibbald, 1987). De ahí la importancia de corregir la concentración de aminoácidos presentes en las excretas, lo que se logra al descontar de éstas las fracciones de material endógeno presente. En el caso particular de los aminoácidos, cuando se establece la diferencia entre la cantidad que se absorbe del tracto digestivo y la cantidad excretada del aminoácido en las heces, el resultado se denomina coeficiente de digestibilidad (Parsons, 1991).

Hasta ahora se han realizado importantes esfuerzos para optimizar el uso de la proteína en los alimentos para camarón al sustituir el criterio de cantidad de proteína por el de su calidad, al considerar el perfil de los aminoácidos esenciales presentes en los ingredientes (Tacon *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2006). Al tomar en cuenta la cantidad de cada ingrediente que es digerido por el camarón en este proceso, se puede inferir que al sustituir el requerimiento de proteína y aminoácidos con base en su concentración total por unidades digeribles, se define mejor la calidad de los ingredientes. Así mismo, ofrecer una cantidad más exacta de cada aminoácido que puede ser utilizada por el animal; ante el potencial mejor balance de aminoácidos, se puede reducir la contaminación por el nitrógeno excretado al medio ambiente, que resulta en una ventaja importante de la formulación a proteína ideal o con base en aminoácidos digeribles (Baker, 1997).

JUSTIFICACIÓN

Es importante considerar que para optimizar el cultivo sustentable del camarón es imperativo cuidar la calidad del agua, ya que su degradación provoca que los animales sean más propensos al estrés, a enfermedades y a presentar una menor tasa de crecimiento (Martínez-Córdova *et al.*, 2002), además de tener consecuencias de impacto ambiental en el entorno. En gran medida, el éxito del cultivo intensivo del camarón depende de la calidad del alimento y de su adecuado manejo, por lo que se debe evitar que éste sea de baja digestibilidad y ofrecerse en exceso, ya que puede convertirse en una fuente de contaminación (Tacon, 2002). Recientemente, ha surgido en la acuicultura el concepto de “alimentos amigables” como una alternativa para reducir el impacto contaminante de los alimentos en los estanques, ya que es deseable que estos ingredientes contengan nutrimentos altamente disponibles para el animal (Kureshy y Davis, 2002).

Las proteínas son la principal fuente de nitrógeno que entra a los sistemas de cultivo, en virtud de que hasta un 90% de ese compuesto lo hace por medio del alimento balanceado (Jackson *et al.*, 2003), siendo además un vector de contaminación, dado que en algunas granjas hasta un 72% del nitrógeno proteico es eliminado en el agua de recambio (Teicher-Coddington *et al.*, 2000) con impactos negativos sobre el ambiente (Primavera, 1997; Montoya *et al.*, 2002).

Además del impacto contaminante, el desecho de nitrógeno arrojado hacia el medio ambiente constituye una pérdida económica que repercute en la rentabilidad del negocio de cultivo del camarón, dado que se origina de las proteínas, que son parte fundamental de los

nutrimentos y representan el mayor costo en la formulación (Cromwell, 1998; Friman, 2001; Jackson *et al.*, 2003).

El nitrógeno disuelto en el agua representa un elemento que afecta negativamente al desempeño productivo del camarón, pero también en el futuro su emisión al ambiente será más restringida por reglamentaciones más estrictas que se generan continuamente en distintos países (Leclerq, 1998; Wilson, 2002). Por otra parte, se requiere una gran cantidad de energía metabólica para eliminar el exceso de nitrógeno proteico no empleado por el organismo, debido a la menor eficiencia para incorporar aminoácidos a los tejidos corporales ante un exceso o un desequilibrio de los mismos en el alimento (Bonn *et al.*, 1991; Cuarón, 1991; Coon, 2004).

Por ello, al cubrir el requerimiento de nitrógeno del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en unidades de proteína digerible en sustitución del contenido de proteína total, se da un primer paso importante en la formulación, definiéndose con mayor precisión el nivel de calidad de los ingredientes y permitiendo ofrecer la cantidad de proteína que realmente está siendo utilizada por el animal, lo que potencialmente reduce el exceso de ese nutriente.

De conformidad con lo expuesto anteriormente y dado que actualmente no existe información publicada relativa a la composición de aminoácidos esenciales digeribles en las principales materias primas empleadas en la formulación de alimentos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, y a que tampoco se ha determinado cual es el nivel óptimo

del primer aminoácido limitante y de proteína en base digerible en alimentos para camarón, en el presente trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

Si los alimentos para camarón cubren con más exactitud los requerimientos de proteína digerible y metionina total, la cantidad de proteína cruda en el alimento será menor y habrá un uso más eficiente del nitrógeno, con respecto a los alimentos que no cubren los requerimientos o que estén desequilibrados o sobreformulados (con exceso de ciertos aminoácidos).

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la digestibilidad aparente *in vivo* de materia seca, proteína y aminoácidos de diversos ingredientes, para aplicarla al estudio de requerimientos nutricionales en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos específicos

- Determinar la digestibilidad aparente *in vivo* de materia seca, proteína y aminoácidos esenciales de 17 ingredientes de origen marino y terrestre en organismos juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei*.

- Determinar el efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y de metionina en el alimento sobre el crecimiento y utilización del alimento en juveniles de camarón *L. vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento I: Determinación de la digestibilidad aparente in vivo de proteína y aminoácidos esenciales de 9 ingredientes de origen marino y 8 de origen terrestre

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur, México.

I.1. Ingredientes y alimentos experimentales

Para el desarrollo del experimento de digestibilidad proteica y de aminoácidos esenciales se fabricaron 18 alimentos, que corresponden a 17 ingredientes, 9 de origen marino y 8 de origen terrestre, y un alimento control.

I.1.1. Ingredientes de origen marino

Los 9 ingredientes de origen marino (Tabla III) incluyeron a 4 harinas de pescado: una harina testigo de sardina entera (HPA), correspondiente a un lote del año 2005 de la planta Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México; harina de sardina entera (HPB) de un lote del año 2006 y elaborada por Productos de Ensenada B.C., México; harina de sardina entera (HPC) de uno de los lotes del año 2006 de la planta Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México) y harina de desechos de atún (HPD) (lote del año 2006, fabricada por Marín Industrias, Manzanillo, Colima. México). También se incluyó en el experimento un concentrado proteico de solubles de pescado (CPSP), harina de cabeza de camarón (HCAM) y harina de calamar (HCAL), así como dos harinas fabricadas en el laboratorio: langostilla (HLAN) y de desechos de almeja catarina (HDAC).

Tabla III. Ingredientes de origen marino evaluados en la prueba de digestibilidad.

Ingredientes	Clave del experimento
Harina de sardina entera Monterrey ¹	HPA
Harina de sardina entera Monterrey ²	HPB
Harina de sardina entera Monterrey ³	HPC
Harina de residuos del fileteado de atún ⁴	HPD
Harinas misceláneas:	
Harina de desechos de almeja catarina ⁵	HDAC
Concentrado proteico de solubles de pescado ⁶	CPSP
Harina de langostilla ⁷	HLAN
Harina de cabeza de camarón ⁸	HCAM
Harina de calamar ⁸	HCAL

¹Lote 2005 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). ²Lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). ³Lote 2006 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). ⁴Lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima, México). ⁵*Argopecten ventricosus* (preparada en el CIBNOR según Goytortúa-Bores *et al.* (2006). ⁶SOPROPECHE, Boulogne, Francia. ⁷*Pleuroncodes planipes* (preparada en el CIBNOR según Goytortúa-Bores *et al.* (2006). ⁸*Litopenaeus vannamei* (Proteínas Marinas y Agropecuarias, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México). ⁹*Loligo gahi*, Chile Exportadora, Santiago, Chile).

I.1.2. Ingredientes de origen terrestre

En el caso de los ingredientes de origen terrestre (Tabla IV), se encuentran tres ingredientes de origen animal: caseína, harina de subproductos de rastro avícola (HSPA) y harina de subproductos de rastro porcícola (HSPP), además de 5 ingredientes de origen vegetal: harina de trigo (HTRI), harina de sorgo (HSOR), pasta de soya (PSOY), gluten de trigo (GLT) y gluten de maíz (GLM).

Tabla IV. Ingredientes de origen terrestre evaluados en la prueba de digestibilidad

Ingredientes¹	Clave del experimento
De origen animal:	
Caseína ²	CASE
Harina de subproductos avícolas ³	HSPA
Harina de subproductos porcícolas ⁴	HSPP
De origen vegetal:	
Harina de trigo ⁵	HTRI
Harina de sorgo ⁶	HSOR
Pasta de soya ⁷	PSOY
Gluten de maíz ⁸	GLM
Gluten de trigo ⁹	GLT

¹Tamizados a 250 μ m, excepto harina de cerdo (500 μ m). ²SIGMA C-3400. ³Harina de subproductos de pollo y pavo en rastro (Ind. Griffind. Jackson, MI, EUA). ⁴Subproducto de rastro: cerdo CONAGRA, Iowa, EUA. ⁵Valle de Santo Domingo, B.C.S., México. ⁶AGYDSA. Guadalajara, Jalisco, México. ⁷Harinera Parayas, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. ⁸EURONUTEC, Querétaro, Qro., México. ⁹PROBST S.A. de C.V., Tlalnepantla, Edo. de México, México.

Los ingredientes fueron finamente molidos en un pulverizador (Molinos Pulvex, D.F. México) y tamizados a través de un tamiz de 250 μ m, con excepción de la harina de cerdo (HSPP) que fue tamizada únicamente a 500 μ m, ya que su elevado contenido de grasa no permitió su paso por un tamiz de menor calibre. Se almacenaron en bolsas de plástico selladas y depositadas en cubetas herméticas bajo condiciones de refrigeración (4°C) hasta el momento de la toma de muestras para los análisis químicos respectivos o fabricación de los alimentos.

I.2. Evaluación química de ingredientes y alimentos experimentales

I.2.1. Análisis químico proximal

Se analizaron por triplicado los ingredientes y los alimentos experimentales fabricados en la planta de alimentos del CIBNOR. El análisis químico proximal desarrollado fue de acuerdo a la metodología recomendada por la AOAC (2005). La humedad se determinó por secado en estufa a 70 °C durante 24 h. La cuantificación de cenizas (C) o minerales (método 942.05), se desarrolló por incineración de las muestras en una mufla (Thermolyne modelo F6000, Dubuque, IA, EUA) a 550 °C durante 6 h.

El análisis de proteína cruda (PC) (método 2001.11), se realizó de manera indirecta cuantificando la concentración de nitrógeno en las muestras en un digestor (Kjeltec modelo 2040, Foss Tecator, Höganäs, Suiza) y destilador automático (Kjeltec modelo 2300, Foss Tecator, Höganäs, Suiza) con la técnica micro Kjeldahl ($N \times 6.25$). La cuantificación de extracto etéreo (EE) (método 2003.05), se hizo usando un sistema de auto extracción (Soxtec Avanti modelo 2050, Foss Tecator, Höganäs, Suiza), usando como solvente extractor éter de petróleo. Para determinar la fibra cruda (FC) (método 978.10), se usó una hidrólisis ácido-básica con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en un digestor (Fibertec modelo M6, Foss Tecator, Höganäs, Suiza) equipado con una unidad de extracción caliente (modelo 1020, Foss Tecator, Höganäs, Suiza) y una unidad de extracción fría (modelo 1021, Foss Tecator, Höganäs, Suiza).

Se calculó el extracto libre de nitrógeno (ELN), a partir de la diferencia entre 100% y la suma de las determinaciones anteriores. La concentración de proteína se determinó en las

excretas colectadas en el bioensayo de digestibilidad usando la metodología (2001.11) descrita anteriormente (AOAC, 2005).

I.2.2. Energía bruta

Para la determinación de energía de combustión o energía bruta se usó un calorímetro adiabático (Parr Instrument Co., Modelo 1261, Moline, IL, EUA). Para ello, se utilizaron crisoles de acero inoxidable, donde se colocaron pastillas de 1g de las muestras, secadas previamente a 70°C en una estufa por 12 h: se empleó alambre (10 cm) con una aleación de níquel-cobre el cual estaba en contacto con la muestra. La muestra fue incinerada en una cámara de combustión alimentada con oxígeno. Posteriormente, los residuos líquidos de la combustión fueron recuperados y titulados con carbonato de sodio 0.725 N; el naranja de metilo fue empleado como indicador y también se cuantificó la cantidad de alambre calcinado durante la combustión para los cálculos de la energía liberada.

I.2.3. Determinación del perfil de aminoácidos

Para cuantificar el contenido de aminoácidos en los ingredientes (n = 17), alimentos (n = 18) y heces (n = 54) de los camarones, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Agilent 1100 (Santa Clara, CA, EUA). El análisis de los aminoácidos requiere la preparación previa de las muestras por medio de un proceso de hidrólisis, durante este proceso se rompen las uniones en las proteínas y los péptidos mediante un compuesto ácido según el método 994.12 descrito por la AOAC (2005). Sin embargo, el compuesto ácido degrada a los aminoácidos azufrados (metionina y cistina) y su

cuantificación sería subestimada (Wathelet, 1999), por lo que, las muestras que fueron utilizadas para cuantificar a la metionina y a la cistina fueron protegidas, previamente a la hidrólisis ácida, por medio de su oxidación con ácido per fórmico, para ser cuantificados finalmente como metionina sulfona y ácido cisteico, respectivamente (Bonn *et al.*, 1991).

I.2.3.1. Hidrólisis ácida

Para iniciar este procedimiento se emplearon: 10 mg del material a analizar, seco y delipidizado, para muestras con más de 40% de proteína cruda, y 15 mg del material seco delipidizado para muestras con menos de 40% de proteína cruda. Todas las muestras se delipidizaron en el laboratorio de Bromatología usando un equipo Soxtec Avanti (según fue descrito en la sección de análisis químico proximal).

Para la hidrólisis ácida, se adicionaron 3 mL de HCl 6N/fenol a los viales ámbar de 10mL, agitándose por 15 minutos trabajando siempre en la campana de extracción. Se engargolaron los viales con sellos metálicos y se colocaron en una estufa previamente calentada a 110 °C para su hidrólisis por 24 h.

I.2.3.2. Oxidación de las muestras con ácido per fórmico

El proceso de oxidación es requerido para la determinación de los aminoácidos azufrados metionina y cistina. Una vez oxidados, fueron cuantificados como metionina sulfona y ácido cisteico (Bonn *et al.*, 1991; Baker, 1997).

El ácido per fórmico fue preparado según la cantidad de muestras a oxidar en múltiplos de 25 mL; por cada 25 mL de la solución se usaron 0.125g de fenol, 2.5 mL de agua oxigenada y 22.5 mL de ácido fórmico. Estos reactivos fueron mezclados en un vaso de 100 mL y se mantuvieron en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se mantuvo en reposo en el refrigerador (4°C), durante 20 minutos antes de su uso. El reactivo debe estar recién preparado para su uso en la oxidación de la metionina y la cistina.

Las muestras ya pesadas, se mantuvieron en refrigeración (4°C). Se adicionó 1 mL del ácido per fórmico a cada muestra contenida en viales ámbar de 10 mL, los cuales se taparon con la septa y se agitaron por 15 minutos a temperatura ambiente (25°C). El gas generado al quitar la septa fue eliminado con precaución. Se colocaron nuevamente las septas y se sellaron con papel parafilm, trabajando siempre en la campana de extracción.

Finalmente, las muestras se agitaron por 16 horas en un refrigerador (4°C). Después de ese tiempo los viales se elevaron a temperatura ambiente y se retiró el papel parafilm. Se agregaron 0.168 g de meta-bisulfito de sodio a cada uno de los viales, y se agitaron por 45 minutos a temperatura ambiente. A partir de este paso se adiciona el HCl (3 mL, 6N) y se repite el procedimiento que fue descrito anteriormente para la hidrólisis ácida.

I.2.3.3. Preparación de fases móviles

Fase A (1000 mL)

Se pesaron 1.64 g de acetato de sodio anhidro y se transfirieron a un vaso de precipitado de 1 L; se agregó un 1 L de agua desionizada y se agitó hasta que se disolvió completamente, adicionando al final 180 μ l de trietilamina (TEA) y se mezcló. Se ajustó el pH a 7.2 ± 0.05 , adicionando ácido acético al 2%. Por último, se agregaron 3 mL de tetrahidrofurano (THF), y se mezcló. La fase terminada se filtró en una membrana de nylon de 45 μ m.

Fase B (1000 mL)

Se pesaron 1.64 g de acetato de sodio anhidro que fueron transferidos a un vaso de precipitado de 1 L, agregando 200 mL de agua desionizada y ajustando el pH a 7.2 ± 0.05 , adicionando ácido acético al 2%. Al final se agregaron 400 mL de acetonitrilo y 400 mL de metanol, se mezcló, y se filtró la fase usando una membrana de nylon de 45 μ m.

I.2.3.4. Derivatización

La derivatización se desarrolló en un sistema de dos fases: Fase A (acetato de sodio 0.003 M, pH 7.2, tetrahidrofurano) y Fase B (acetato de sodio/acetonitrilo 1:4, 0.1 M, pH 7.2). Los derivatizantes usados fueron OPA (σ -optal-aldehído y ácido 3-mercapto-propiónico (Agilent Technologies, No. 5061-3335) y FMOC (9-fluorenil-metilcloro-formato (Agilent Technologies, No. 5061-3337).

Se usó una columna hipersil ODS 5 μm (200 \times 2.1 mm, Agilent) para los nueve aminoácidos esenciales analizados, protegida con una pre-columna hipersil ODS Agilent (20 \times 2.1 mm), y una columna microsorb (100-3 C18, 100 \times 4.6 mm, Varian, Lake Forest, CA) para el análisis de cistina.

El análisis de aminoácidos (Wu *et al.*, 1997) fue realizado en un equipo de cromatografía de alta resolución HPLC fase-reversa (Model 1100, Hewlett Packard, Santa Clara, CA). Para la determinación se inyectó 1.0 μl de la muestra a un flujo de 0.45 mL/min a una temperatura de columna de 40 °C. El gradiente del derivatizante se inició con 100% fase A, a los 17 min del inicio 60% de fase B, continuando con 100% de fase A (a 18 min del inicio); a los 18.1 min el flujo fue de 0.45 mL/min, de los 18.5 min a los 23.9 min el flujo fue de 0.8 mL/min, continuando a los 24 min con 100% de la fase B a un flujo de 0.45 mL/min, y concluyendo a los 25 min con 0% de la fase B.

I.3. Formulación de alimentos

Los alimentos se formularon con la ayuda del paquete Brill Formulation (V.1.35.003, Feed Management System, Fairmont, MN, EUA) tomando en cuenta la composición química proximal y de energía de los ingredientes.

I.3.1. Alimento de referencia

Se diseñó un alimento de referencia o mezcla base con 35% de proteína (Tabla V) cubriendo los requerimientos nutrimentales de proteína y aminoácidos reportados para juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Tacon *et al.*, 2002).

Tabla V. Composición (%) de los alimentos de referencia (AR) y de prueba (AP) (g/100g en base húmeda) usados para medir la digestibilidad de ingredientes.

Ingrediente	AR	AP
Harina de pescado ¹	33.60	23.52
Harina integral de trigo ²	20.00	14.00
Pasta de soya ³	30.11	21.08
Aceite de sardina ⁴	4.00	2.80
Almidón de maíz ⁵	3.50	1.55
Ácido algínico ⁶	2.00	2.00
Lecitina de soya ⁷	2.00	1.40
Premezcla de vitaminas ⁸	1.80	1.26
Fosfato dibásico de sodio ⁹	1.20	0.84
Oxido de cromo ¹⁰	1.00	1.00
Premezcla de minerales ¹¹	0.50	0.35
Cloruro de colina (62% agente activo) ¹²	0.20	0.14
Vitamina C (35% agente activo) ¹³	0.09	0.06
Butil-hidroxi-tolueno (BHT) ¹⁴	0.004	0.003
Ingredientes a evaluar	—	30.00
Total	100.00	100.00

¹HP0508-2, Sardina Monterrey, lote 2005, Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México.

²HT0508, Harinera Parayas, S. A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. ³PSoy0507-1, AGYDSA, Guadalajara, Jalisco, México. ⁴Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México. ⁵SIGMA # cat. S-4126, St. Louis, MO, EUA. ⁶Sigma-Aldrich 180947-05031-1, St. Louis, MO, EUA. ⁷Restaurant vegetariano Rey Sol, La Paz, B.C.S., México. ⁸VITCRU0409: Acetato de vitamina A, 15000 IU; D3, 7500 IU; E, 400 mg; K₃, 20 mg; Tiamina monohidrato, 150 mg; riboflavina, 100 mg; piridoxina HCl, 50 mg; ácido pantoténico, 100 mg; niacina, 300 mg; biotina, 1 mg; inositol, 500 mg; ácido fólico, 20 mg; cianocobalamina, 0.1 mg. ⁹SIGMA-ALDRICH # cat. S0876, Sigma Co. St. Louis, MO, EUA. ¹⁰IMPEX # cat. 12233101162 Monterrey, N.L., México. ¹¹MINCRU0409 (g/kg alimento): MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.09; KCl, 0.5; MnCl₂·4H₂O, 0.0234; CuCl₂·2H₂O, 0.005; KI, 0.5; CoCl₂·6H₂O, 0.0025. ¹²ICN # cat. ICN101386 ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, EUA. ¹³ROCHE, D. F., México. ¹⁴Butil-hidroxi-tolueno, ICN # cat. 101162, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, EUA.

I.3.2. Alimentos experimentales

Se diseñaron 18 alimentos en total, un alimento control y 17 alimentos prueba, compuestos por la mezcla base de referencia y cada uno de los 17 ingredientes a evaluar (Tabla IV), incorporándolos a un nivel de inclusión de 30%, usando 1% de óxido crómico (IMPEX, No. cat. 12233101162, Monterrey, N.L., México) como marcador inerte para medir la

digestibilidad aparente según el método de Cho y Slinger (1979) y 2% de ácido algínico como aglutinante.

I.4. Fabricación de alimentos

Los alimentos se elaboraron en la Planta de Alimentos del CIBNOR basándose en el método reportado en Civera y Guillaume (1989). Previamente se prepararon 126 kg de la mezcla base, a partir de la cual se fabricaron el alimento control y los 17 alimentos prueba, asegurándose una mejor uniformidad entre los alimentos.

Para preparar el alimento de referencia y los 17 alimentos de prueba se procedió de la siguiente manera: los ingredientes secos menores (mezcla A) incluyendo la premezcla de vitaminas, el fosfato dibásico de sodio, la premezcla de minerales, el cloruro de colina, la vitamina C y el antioxidante, fueron premezclados con el almidón de maíz por 15 minutos en una mezcladora vertical (Kitchen Aid^{MR}, St. Joseph, MI, EUA). En la mezcla A no fueron incorporados ni el ácido algínico, ni el óxido de cromo.

Posteriormente, se procedió a realizar una segunda mezcla en la cual se adicionaron la harina de sardina, la pasta de soya y la harina de trigo (mezcla B). En este caso se utilizó una mezcladora con capacidad nominal de 20 kg, empleando 15 minutos de mezclado. Las mezclas A y B se mezclaron por 15 minutos.

Se prepararon en total 12.0 kg de la combinación de las mezclas A+B, de los cuales se tomaron 910 g para el alimento de referencia y 628 g para cada uno de los 17 alimentos de

prueba. Finalmente, el ácido algínico (2%) y el óxido de cromo (1%) fueron adicionados tanto al alimento de referencia como a los 17 alimentos de prueba. Por otra parte, se agregaron 300 g de cada ingrediente a evaluar a los alimentos de prueba. Por último, se preparó una emulsión elaborada con el aceite de pescado y la lecitina de soya, la cual fue adicionada al final para después mezclar por 15 minutos en una mezcladora vertical (Kitchen Aid^{MR}, St. Joseph, MI, EUA) para con ello completar un kilogramo de cada alimento mencionado. Una vez mezclados todos los ingredientes, se agregó una cantidad de agua a 40°C, aproximadamente al 35% del peso de la mezcla sólida. La masa resultante fue extrudida en un molino de carne (Tor-Rey^{MR}, MJ12, Monterrey, N.L., México) en dos ocasiones para obtener pellets de 2 mm de diámetro, los cuales fueron cortados manualmente con una espátula y secados en una estufa con flujo de aire a 40 °C hasta que los pellets alcanzaron una humedad máxima de entre 8 y 11% aproximadamente. Posteriormente, los alimentos se embolsaron, etiquetaron y fueron almacenados bajo refrigeración (4 °C) hasta su uso.

I.4.1. Hidroestabilidad de los alimentos

Se determinó la hidroestabilidad de los 18 alimentos fabricados siguiendo la metodología recomendada por Obaldo *et al.*, (2002). Se pesaron 4g de alimento (% de humedad conocida) y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 200 mL de agua a 38‰. Los alimentos en inmersión estuvieron sujetos a agitación por una hora a 100 rpm y 27 °C en un agitador horizontal (Daigger Hot Orbital Shaker, Vernon Hills, IL, EUA). Se modificó la técnica con respecto a lo estipulado por Obaldo *et al.* (2002) ya que se usó de agua salada con 40‰ en sustitución de agua con 34‰. Asimismo la temperatura del agua

se usó a 27 °C en lugar de 25 °C, ya que esas son las condiciones de salinidad y temperatura bajo las cuales se desarrollaron los bioensayos.

Después del proceso descrito anteriormente, las muestras de alimento contenidas en cada matraz se filtraron a través de papel Whatman No. 3 con la ayuda de una bomba de vacío. El papel filtro con el alimento residual fue secado en una estufa con flujo de aire a 105°C por 24h. La fórmula utilizada para determinar el porcentaje de materia seca retenida o estabilidad de la muestra en el agua, fue la siguiente:

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

I.5. Sistema experimental

El bioensayo para determinar la digestibilidad de proteína y aminoácidos en los ingredientes alimenticios se realizó en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, que cuenta con acuarios de fibra de vidrio de color gris con capacidad de 60 L (50 x 55 x 38 cm). Cada uno estuvo equipado con los siguientes aditamentos: una malla mosquitero para evitar la fuga de organismos, un calentador sumergible de 200W (EBO-JAGER, Eheim GmbH & Co., KG Deizisau, Alemania) ajustable para mantener la temperatura del agua alrededor de $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Los acuarios estuvieron equipados con un sistema de drenaje para el recambio de agua, y limpieza de los acuarios y del laboratorio,

además de un exhaustor externo para airear el agua con mangueras alimentadas por un soplador de 5 HP, y con ello mantener niveles de oxígeno disuelto iguales o mayores a 5 mg/L.

El agua de mar (entre 36 y 40 ‰) se abasteció a los acuarios iniciando en una toma a 300 m de la orilla del mar, con una bomba de 15 HP que envía el agua a una cisterna externa con capacidad de 240 m³; posteriormente el agua se envía hacia otra cisterna de 5 m³ pasando por un filtro de arena de 70 micras (Cristal-Flo, Modelo T240BP1 Santa Rite Industries Inc., Delavan, WI, EUA). El agua se bombeó hacia los acuarios, pasando previamente a través de filtros de arena (70μ), de cartuchos (10 y 5μ) y luz ultravioleta.

Los acuarios contaron con un sistema de iluminación de luz de neón de 200 W y el control artificial del fotoperíodo se realizó por medio de un reloj automático (timer). El fotoperíodo utilizado durante la colecta de heces fue de 12 horas de luz constante a partir de las 6:00 am y 12 horas de oscuridad.

I.6. Organismos

Se trabajó con camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*; Bonne, 1931) que fueron adquiridos en la granja Acuacultores de la Península (APSA) ubicada al norte de la ciudad de La Paz, B.C.S. Antes de iniciar los experimentos, los animales se mantuvieron en tanques por cuatro meses y fueron sujetos a las condiciones de manejo convencionales del laboratorio (presencia de humanos, recambio de agua y alimentación manual) en el

Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR. El manejo se realizó en tanques de fibra de vidrio color azul con capacidad de 2,500 L, y se alimentaron dos veces al día (10:00 y 16:00 hrs) con alimento comercial para camarón (35% de proteína en base húmeda). Esta etapa fue necesaria para permitir que los camarones alcanzaran el peso requerido para optimizar el tiempo de colecta de las heces.

I.7. Diseño experimental y condiciones de cultivo del ensayo de digestibilidad

Se realizó un bioensayo usando camarones sub-adultos con peso de 15-19 g, distribuidos en los acuarios de fibra de vidrio que fueron descritos anteriormente, a una densidad de 4 animales por acuario y con 3 réplicas por tratamiento o ingrediente a evaluar.

Los acuarios por tratamiento, fueron distribuidos aleatoriamente en la unidad experimental. Diariamente se monitorearon parámetros fisicoquímicos en el agua de los acuarios: temperatura, salinidad y oxígeno disuelto. Se realizó la limpieza de los acuarios por sifoneo, eliminando exoesqueletos de mudas, organismos muertos, heces excretadas durante la noche y restos de alimento, para posteriormente hacer un recambio del 60% del volumen total de agua. Estas operaciones se realizaron por la mañana antes de ofrecer la primera alimentación; los organismos se alimentaron a las 9:00, 13:00 y 17:00 hrs.

Los camarones tuvieron un período de aclimatación de 7 días a los alimentos verdes (con óxido crómico) y se ofreció el alimento tres veces al día, a manera que siempre hubiera una pequeña cantidad excedente (aproximadamente el 5% de la biomasa en cada acuario). Las

heces se colectaron en cada acuario utilizando un sifón, en un período no mayor a los 90 minutos después de cada alimentación, las heces colectadas se enjuagaron suavemente con agua destilada, se mantuvieron en congelación (-50°C) y se secaron en una liofilizadora con capacidad de 5L (Modelo 12525, Virtis Co., Gardiner, NY, E.U.A). El bioensayo de digestibilidad finalizó hasta que se colectaron 15g de heces húmedas por acuario; esa cantidad se calculó como la requerida para realizar los análisis de laboratorio planeados. Los análisis de proteína y aminoácidos en las excretas se realizaron por triplicado (AOAC, 2005).

I.7.1. Cuantificación del óxido crómico en alimentos y heces

El óxido crómico es utilizado como marcador inerte, en virtud de que permite desarrollar pruebas de digestibilidad sin necesidad de coleccionar la totalidad de la excretas de los animales.

La técnica para cuantificar el porcentaje de óxido crómico (Furukawa y Tsukahara, 1966) se realizó pesando por sextuplicado 50 mg de las muestras de alimentos y heces finamente molidas, las cuales se colocaron en tubos de digestión aforados a 100 mL, adicionando 5 mL de ácido nítrico HNO₃ (90%) por tubo. Los tubos se colocaron en un monoblock de digestión (AMI 500, Scientific Pty Ltd., Australia, CA) a 120 °C de temperatura por 90 min; la primera etapa del proceso concluye con un cambio a color verdoso esmeralda claro de la solución. Con los tubos ya fríos, se adicionaron 3 mL de ácido perclórico (70%) iniciando con ello una segunda digestión a 203 °C durante 120 min (tiempo durante el cual la solución debe virar del color verde inicial a un amarillo limón). Al final de la reacción, y con los tubos fríos, se

observa un anillo rojo en la superficie de la solución. Por último, se utilizaron matraces volumétricos de 100 mL (conteniendo la solución final de la digestión) los cuales se aforaron con agua destilada. Se tomaron muestras de la solución aforada y se leyó su absorbancia a 350 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640 (Brea, CA, EUA).

Los cálculos para obtener la concentración de óxido crómico en las muestras se desarrollaron con la siguiente fórmula:

$$X = \left(\frac{Y - 0.0032}{0.2089} \right)$$

Los valores 0.0032 de la ordenada al origen y 0.2089 de la pendiente son constantes.

En donde:

X = cantidad de óxido de cromo presente en la muestra

Y = absorbancia

En donde:

$$\% \text{ Oxido crómico} = 100 \times \left(\frac{X}{A} \right)$$

A = Peso de la muestra

I.7.2. Cálculo de los coeficientes de digestibilidad aparente

Los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), de proteína (DAP) y aminoácidos (DAAA) del alimento de referencia (Tabla V) fueron calculados usando las siguientes ecuaciones (Cho y Slinger, 1979):

$$\% \text{ DAMS} = 100 - 100 (\% \text{ Cr en el alimento} / \% \text{ Cr en las heces})$$

$$\% \text{ DAP} = 100 - 100 (\% \text{ Cr en el alimento} / \% \text{ Cr en las heces}) \times (\% \text{ PC heces} / \% \text{ PC en alimento})$$

$$\% \text{ DAAA} = 100 - 100 (\% \text{ Cr en el alimento} / \% \text{ Cr en las heces}) \times (\% \text{ AA heces} / \% \text{ AA en alimento})$$

Donde: Cr = óxido crómico; PC = % de proteína cruda; AA = % aminoácido

Para el caso de los ingredientes experimentales (IE), los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), de la proteína (DAP) y de los aminoácidos (DAAA) se calcularon usando las siguientes ecuaciones (Bureau y Hua, 2006):

$$\% \text{ DAMS} = \text{DAMS}_{\text{alimento de prueba}} + [(\text{DAMS}_{\text{alimento de prueba}} - \text{DAMS}_{\text{alimento de referencia}}) \times (0.7 \times \text{MS}_{\text{alimento de referencia}} / 0.3 \times \text{MS}_{\text{IE}})]$$

$$\% \text{ DAPIE} = \text{DAP}_{\text{alimento de prueba}} + [(\text{DAP}_{\text{alimento de prueba}} - \text{DAP}_{\text{alimento de referencia}}) \times (0.7 \times \text{PC}_{\text{alimento de referencia}} / 0.3 \times \text{PC}_{\text{IE}})]$$

$$\% \text{ DAAAIE} = \text{DAAA}_{\text{alimento de prueba}} + [(\text{DAAA}_{\text{alimento de prueba}} - \text{DAAA}_{\text{alimento de referencia}}) \times (0.7 \times \text{AA}_{\text{alimento de referencia}} / 0.3 \times \text{AA}_{\text{IE}})]$$

Donde: IE = ingrediente experimental; MS = % de materia seca, PC = % de proteína cruda (base húmeda); AA = % aminoácido (base húmeda).

I.7.3. Análisis estadísticos

Para los coeficientes de digestibilidad se utilizó el análisis de varianza de una vía, a fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos, y una posterior comparación de medias de Tukey (Steel y Torrie, 1996) con un nivel de confianza del 95%. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software de estadística SAS, 1999, (V.8, SAS Institute Inc., Cary, NC. USA).

Experimento II. Determinación del efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y metionina en el alimento sobre el crecimiento y utilización del alimento en juveniles de camarón *L. vannamei*

II.1. Bioensayo de crecimiento

Se realizó un bioensayo de crecimiento en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR para evaluar 20 alimentos con 4 niveles de inclusión de proteína digerible y 5 niveles de metionina protegida.

II.1.1. Organismos

Se utilizaron juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* obtenidos del laboratorio comercial Acuicultores de la Península, S.A. de C.V., La Paz, B.C.S. Los camarones fueron aclimatados al manejo y condiciones del laboratorio por dos semanas, dentro de tanques de plástico con capacidad de 500 litros, a una temperatura de 27°C y salinidad de 40‰. Los organismos fueron alimentados dos veces al día (10:00 y 17:30h) dando el 50% de la ración en la mañana y el otro 50% por la tarde. Se utilizó un alimento comercial (PIASA^{MR}) para camarón con 35% de proteína. El horario de alimentación obedeció a la experiencia previa que se tuvo en el bioensayo de digestibilidad (con 54 acuarios), ya que se requerían de alrededor de tres horas para realizar el manejo de mantenimiento de los 60 acuarios usados en el bioensayo de crecimiento, antes de servir la primera ración de comida, la segunda comida se ofrecía antes de que los timers desconectaran la luz artificial (18:00h).

II.1.2. Alimentos experimentales

II.1.2.1. Formulación y fabricación de los alimentos

La formulación de los alimentos se realizó con el programa Nutrion^{MR} (Guadalajara, Jalisco, México). En la formulación de los alimentos experimentales, se empleó la base de datos generada con los resultados de la composición química y de digestibilidad aparente *in vivo* de proteína y aminoácidos determinada en los distintos ingredientes alimenticios (Tablas VII~XVI). La metodología para la fabricación de los alimentos usados en el bioensayo de crecimiento, fue similar a la descrita en la sección I.4.

Se diseñaron 20 alimentos en total, consistentes en 4 niveles de proteína digerible (18, 23, 28 y 33%) y 5 niveles de DL-metionina cristalina (0.00, 0.17, 0.33, 0.50 y 0.66%) protegida con carboxi-metil-celulosa (CMC), la metodología del proceso se explica en siguiente sección II.1.2.2.

La composición en ingredientes de los alimentos se muestra en la Tabla VI. Los cuatro niveles de proteína digerible usados en el experimento se planearon tomando en consideración las demandas de proteína cruda recomendadas previamente para camarones peneidos (Akiyama y Dominy, 1990). Los niveles de metionina cristalina protegida usados fueron calculados en cantidades menores y superiores al requerimiento de metionina total estimado por Tacon *et al.* (2002). La DL-metionina cristalina fue protegida con CMC (sección II.1.2.2.) e incluida en los alimentos de cada nivel de proteína digerible, a expensas de almidón. La concentración inicial de metionina en los alimentos sin

suplementación de metionina protegida fue de 0.25, 0.35, 0.45 y 0.55%, para los 4 niveles de proteína (18, 23, 28 y 33%), respectivamente.

Tabla VI. Composición (% en base húmeda) de los alimentos usados en el bioensayo para determinar el efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y metionina en el alimento de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Ingredientes	Nivel de proteína digerible %			
	18.0	23.0	28.0	33.0
Harina integral de trigo	64.32	59.62	45.00	30.52
Harina de cabeza de camarón	0.00	1.63	12.91	24.17
Pasta de soya	16.10	7.96	11.60	15.21
Gluten de trigo	3.78	15.00	15.00	15.00
Aceite de hígado de bacalao	5.00	5.00	4.70	4.30
Lecitina de soya	3.00	3.00	3.00	3.00
Acido algínico	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla de vitaminas	1.80	1.80	1.80	1.80
Fosfato dibásico de sodio	1.20	1.20	1.20	1.20
Almidón de maíz	1.00	1.00	1.00	1.00
DL-metionina protegida*	variable	variable	variable	variable
Oxido de cromo	1.00	1.00	1.00	1.00
Premezcla de minerales	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina (62% agente activo)	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C (35% agente activo)	0.09	0.09	0.09	0.09
BHT (Butil-hidroxi-tolueno)	0.004	0.004	0.004	0.004

*DL-metionina adicionada (%)	Nivel de Met total formulado (%)			
0.00	0.25	0.35	0.45	0.55
0.17	0.40	0.50	0.60	0.70
0.33	0.55	0.65	0.75	0.85
0.50	0.70	0.85	0.90	1.05
0.66	0.85	0.95	1.05	1.15

El origen y características de los ingredientes se pueden consultar en las Tablas III y IV. La composición de las premezclas de vitaminas y minerales se muestran al pie de la Tabla V. * DL-metionina cristalina protegida con CMC.

II.1.2.2. Preparación de la DL-metionina protegida

Se utilizó DL-metionina cristalina FERMEX (catálogo No. 59-51-8, Kyowa Hakko Bio, Co. LTD., Tokio, Japón), previamente tamizada a 250 μ m. También se empleó carboximetil-celulosa (CMC) SIGMA-ALDRICH (catálogo No. 4888, Sigma Co. St. Louis, MO, EUA) para proteger a la metionina cristalina de la lixiviación en el agua (Alam *et al.*, 2004, 2004a; 2005), la cual fue tamizada al mismo tamaño de partícula señalado anteriormente.

La CMC en polvo fue disuelta en agua destilada (15 partes de agua por 85 de CMC) destilada a 60°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, la DL-metionina en polvo fue adicionada en una proporción p/p en seco de 92.5% de DL-metionina y 7.5% de CMC; ambas fueron mezcladas manualmente utilizando una cuchara, durante 15 minutos. La mezcla final quedó con una consistencia y un color blanco, similares a los de una pasta dentífrica convencional. La pasta terminada fue congelada, liofilizada, molida y tamizada a 250 μ m hasta su posterior uso en la fabricación de los alimentos experimentales.

II.1.3. Diseño experimental y condiciones de cultivo

Los 20 alimentos se evaluaron por triplicado. El experimento tuvo una duración de 44 días, durante los cuales se realizaron biometrías cada 15 días, y al momento de su conclusión. Éste se inició con 600 camarones seleccionados con base en su peso vivo (0.248 ± 0.03 g; promedio \pm desviación estándar); se distribuyeron en forma aleatoria en 60 acuarios a una densidad de 10 camarones por acuario. El sistema de cultivo utilizado fue el mismo que se describe en la sección I.1.5.

Durante el bioensayo las variables ambientales temperatura y oxígeno disuelto en el agua se mantuvieron en 27.7 ± 0.36 °C y >4.0 mg/L, valores considerados adecuados para el crecimiento del camarón (Cheng *et al.*, 2002), mientras que la salinidad se mantuvo en 36 ± 0.8 ‰ y el fotoperíodo fue controlado a 12 h luz: 12 h oscuridad (fotofase 06:00 – 18:00 hrs).

Diariamente se monitoreó la temperatura con un termómetro de mercurio y el oxígeno disuelto con un oxímetro portátil (YSI, modelo 550A, YSI Incorporated, YellowSpring, OH, EUA). Semanalmente se tomaron lecturas de salinidad al finalizar los recambios de agua, por medio de un refractómetro portátil (Extech Instruments modelo RF20, Walthman, MA, EUA). Se tomaron muestras de agua en acuarios de cada tratamiento y con un número similar de organismos, a los 15, 30 y 43 días de iniciado el experimento, para la determinación de nitritos, nitratos y amonio, mismos que fueron analizados siguiendo las técnicas de Strickland y Parsons (1972) adaptadas según el Manual de Métodos de Lachat Instruments (Milwaukee, WI, EUA) con los métodos QuickChem No. 31-107-04-1A para nitritos y nitratos, y el método No. 31-107-06-1B para el amonio. En la Tabla XXIII en el anexo se presentan los valores mínimos, máximos y promedio de nitritos, nitratos y amonio encontrados para cada alimento experimental.

Al inicio del bioensayo, el alimento se suministró a razón del 10% de la biomasa total de los organismos en cada acuario, y posteriormente se ajustó en función del consumo diario, a manera de que siempre hubiera un excedente (de aproximadamente 20% del alimento suministrado). El alimento fue distribuido en dos raciones al día (50% a las 10:00h y 50% a

las 17:30h). El consumo aparente de alimento fue cuantificado por apreciación visual y registrado. Las mudas y las heces fueron extraídas de los acuarios todos los días por la mañana (09:00h) y posteriormente se realizó un recambio de agua equivalente al 80% del volumen total.

II.1.4. Criterios de evaluación

Los organismos fueron pesados individualmente en una balanza modelo QT-200 (Adam Equipment, Danbury, CT, EUA) con una capacidad máxima de 200 g y una precisión de 0.001 g, eliminando el exceso de agua del cuerpo del camarón por medio de papel absorbente. Se calcularon los índices zootécnicos más comunes: supervivencia, peso corporal, alimento aparente consumido, conversión alimenticia y eficiencia proteica con las fórmulas que se describen a continuación:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número final de organismos}}{\text{Número inicial de organismos}} \times 100$$

$$\text{Consumo aparente de alimento} = \text{Alimento suministrado} - \text{Alimento residual}^*$$

*estimación visual del alimento residual en los acuarios.

$$\text{Conversión alimenticia (CA)} = \frac{\text{Alimento aparente consumido (g)}}{\text{Incremento en peso corregido (g)}}$$

donde: Incremento en peso corregido (IPC):

$$\text{IPC} = \frac{\text{Biomasa final} + (\text{peso promedio final} + \text{peso promedio inicial} \times \text{No. muertos}) - \text{Biomasa inicial}}{\text{Biomasa inicial}}$$

(Kitabayashi *et al.*, 1971).

$$\text{Eficiencia proteica (EP)} = \frac{\text{Incremento en peso corregido (g)}}{\text{Proteína aparente consumida (g)}}$$

Una vez finalizado el bioensayo de crecimiento, y dadas las grandes diferencias de peso obtenidas entre los niveles de proteína, se utilizaron cinco organismos de cada uno de los siguientes tratamientos para determinar el contenido de proteína cruda en el músculo de la cola, ya que los análisis preliminares indicaron que no había diferencias entre niveles de metionina: 18% PD (0.25% de DL-metionina) y 23% PD (0.35% de DL-metionina), 28% PD (0.45, 0.75 y 1.05% de DL-metionina) y 33% PD (0.55, 0.85 y 1.15% de DL-metionina). Para ello, se disectaron 40 organismos en estadio de intermuda “C”, mismo que fue determinado por el grado de desarrollo setal o setogénesis de los urópodos de los camarones, usando un estéreomicroscopio (Lieder modelo MC-319, Portland, OR, EUA) con una lente de 40X. La concentración de proteína cruda en el músculo de la cola se determinó siguiendo el método Kjeldahl (AOAC, 2005).

II.1.5. Análisis estadísticos

Se llevó a cabo un análisis de normalidad y homocedasticidad de varianzas de los datos utilizando las pruebas de Lillieford y Bartlett (Ott, 1992; Sokal, 1995).

Se utilizó un análisis de varianza en un diseño anidado con dos factores: el primero fue los niveles de proteína digerible y el segundo factor los niveles de metionina total. El factor de proteína digerible (PD) constó de cuatro niveles y el factor metionina total de cinco niveles (% anidados) dentro de cada nivel de PD de la siguiente manera: 18%PD (0.25, 0.40, 0.55, 0.70 y 0.85), 23%PD (0.35, 0.50, 0.65, 0.80 y 0.95), 28%PD (0.45, 0.60, 0.75 y 0.90) y 33%PD (0.55, 0.70, 0.85, 1.0 y 1.15), todos los niveles mencionados se expresan en base húmeda, empleando el mismo diseño para el tratamiento de los principales criterios zootécnicos (peso corporal final, consumo aparente de alimento, conversión alimenticia y eficiencia proteica).

Se compararon las medias globales por nivel de proteína digestible (efectos principales) independientemente del nivel de metionina y las medias por nivel de metionina (niveles anidados dentro de proteína digestible), usando la prueba de Tukey en los casos en donde se encontró efecto significativo de los tratamientos.

El modelo estadístico usado fue el siguiente:

$$Y = \mu + T_i + A_{(i)j} + S_{(i)j} + TA_{ij} + S$$

Donde:

Y: es la variable de respuesta del i-ésimo nivel de proteína digerible en el k-ésimo nivel de metionina total.

μ : es la media teórica de la población.

T_i : Efecto del i -ésimo tratamiento (proteína digerible).

$A_{(ij)}$: Efecto del j -ésimo nivel de metionina dentro del i -ésimo tratamiento.

S: Error aleatorio con distribución NID $(0, S^2)$.

Adicionalmente los datos de peso final fueron analizados por medio de análisis de correlación y regresión con respecto al nivel de metionina en el alimento. Los porcentajes de la variable supervivencia se analizaron con una prueba de proporciones de Chi cuadrada (Steel y Torrie, 1996). Los resultados de contenido de proteína cruda en músculo de la cola fueron analizados con ANOVA unifactorial con 8 niveles, y posteriormente se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey. Todo los análisis se realizaron con ayuda del paquete estadístico SAS v.8 (Institute, Cary, NC, EUA.).

RESULTADOS

Experimento I: Determinación de la digestibilidad aparente in vivo de proteína y aminoácidos esenciales en 9 ingredientes de origen marino y 8 de origen terrestre

I.1. Ingredientes de origen marino

I.1.1. Composición química proximal, energía bruta y aminoácidos contenidos en ingredientes de origen marino

En la Tabla VII se muestran los resultados de la composición proximal y contenido de energía bruta de los nueve ingredientes evaluados en el experimento de digestibilidad. El CPSP resultó con la mayor concentración de proteína cruda con 79.4%, la harina de langostilla tuvo la menor cantidad de proteína cruda (38.1%). El contenido de PC de las cuatro harinas de pescado fluctuó entre 60.5 y 70.2%. El mayor contenido de lípidos fue encontrado en la HPD y en la HDAC (14.1 y 14.5%, respectivamente), mientras que el menor nivel se obtuvo en la HPB (2.8%).

En el caso de la fibra cruda, se detectó un 12.1% en la HLAN y 5.9% en la HCAM; en el resto de los ingredientes la cantidad de fibra fue menor o igual a 1.1%. Por otra parte, los mayores contenidos de cenizas se encontraron en la HDAC (22.2%) y los dos ingredientes fabricados a partir de crustáceos tuvieron los mayores valores de cenizas (HLAN, 39.1% y HCAM, 25.4%); la menor cantidad de cenizas se presentó en el CPSP (11.4%). En lo que se refiere a la energía bruta, el mayor contenido de energía se encontró en la HPD (5.0 kcal g⁻¹) y el menor en la HLAN (3.4 kcal g⁻¹).

Tabla VII. Composición proximal (g/100g de materia seca \pm desviación estándar) y contenido de energía bruta (kcal g⁻¹) de los ingredientes de origen marino evaluados en el experimento de digestibilidad.

Ingrediente	Materia seca	Proteína cruda	Extracto etéreo	Fibra cruda	Cenizas	ELN ¹	Energía bruta	Razón P/E mg PC/kcal
HPA	96.5 ± 0.2	66.2 ± 0.2	9.2 ± 0.3	0.1 ± 0.0	16.6 ± 0.1	7.9	4.60 ± 0.007	143.9
HPB	96.3 ± 0.1	70.2 ± 0.1	6.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	14.1 ± 0.0	7.8	4.8 ± 0.006	146.2
HPC	96.5 ± 0.0	69.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	0.2 ± 0.0	14.9 ± 0.1	12.3	4.7 ± 0.001	148.5
HPD	95.4 ± 0.0	60.5 ± 0.3	14.1 ± 0.2	0.2 ± 0.04	15.8 ± 0.0	9.4	5.0 ± 0.013	121.0
HDAC	95.5 ± 0.1	50.2 ± 0.1	14.5 ± 0.2	0.1 ± 0.0	22.2 ± 0.0	13.0	4.4 ± 0.007	114.0
CPSP	92.0 ± 0.1	79.4 ± 0.3	3.2 ± 0.2	1.1 ± 0.03	11.4 ± 0.2	5.0	4.8 ± 0.041	165.4
HLAN	95.5 ± 0.1	38.1 ± 0.3	4.3 ± 0.2	12.1 ± 0.3	39.1 ± 0.4	6.1	3.4 ± 0.007	112.1
HCAM	95.3 ± 0.0	49.8 ± 0.3	3.5 ± 0.2	5.9 ± 0.2	25.4 ± 0.1	15.3	3.9 ± 0.013	127.7
HCAL	92.5 ± 0.1	71.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0	17.2 ± 0.2	7.5	4.5 ± 0.023	158.2

¹Extracto libre de nitrógeno = 100% - (% proteína cruda + % extracto etéreo + % fibra cruda + % cenizas). P/E= Proteína/energía, PC = proteína cruda. HPA = harina de sardina entera Monterrey, lote 2005 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPB = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). HPC = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPD = harina de atún, lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima, México). HDAC = harina de desechos de almeja catarina, CPSP = concentrado proteico de solubles de pescado, HLAN = harina de langostilla, HCAM = harina de cabeza de camarón, HCAL = harina de calamar. El origen y características de los ingredientes se muestran en la Tabla III.

Los resultados del análisis de aminoácidos se presentan en la Tabla VIII. La Arg fue el aminoácido más abundante, seguida por Leu y Lis en todos los ingredientes. Para el caso de los aminoácidos azufrados, la Met (3.33%) de la harina de calamar y la Met y la Cis (1.58 y 0.77%) en el CPSP tuvieron las concentraciones más altas. Los niveles de ambos aminoácidos fueron relativamente similares en las harinas de pescado A, B y C, mientras que la HPD, la HCAM y la HLAN mostraron una menor cantidad de aminoácidos azufrados.

Tabla VIII. Perfil de aminoácidos esenciales (g/100g de alimento \pm desviación estándar) de los ingredientes de origen marino utilizados en la prueba de digestibilidad.

Ingrediente	Met	Cis	His	Tre	Arg	Val	Fen	Ile	Leu	Lis
HPA	1.33 ± 0.0	0.50 ± 0.1	1.79 ± 0.0	2.23 ± 0.0	3.82 ± 0.0	2.96 ± 0.0	2.29 ± 0.1	2.49 ± 0.1	4.20 ± 0.1	4.12 ± 0.6
HPB	1.2 ± 0.0	0.50 ± 0.0	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.1	3.55 ± 0.2	2.74 ± 0.1	1.70 ± 0.1	2.43 ± 0.1	4.08 ± 0.1	2.62 ± 0.0
HPC	1.2 ± 0.0	0.48 ± 0.8	1.16 ± 0.0	1.92 ± 0.0	3.37 ± 0.1	2.37 ± 1.1	1.63 ± 0.1	2.18 ± 0.0	3.48 ± 0.1	3.20 ± 0.0
HPD	0.95 ± 0.0	0.37 ± 0.1	1.24 ± 0.2	1.66 ± 0.0	2.96 ± 0.0	1.94 ± 0.0	1.43 ± 0.0	1.97 ± 0.0	3.18 ± 0.0	2.68 ± 0.0
HDAC	1.04 ± 0.0	0.54 ± 0.0	0.42 ± 0.0	0.99 ± 0.0	3.71 ± 0.0	1.56 ± 0.1	1.19 ± 0.1	1.68 ± 0.0	2.49 ± 0.0	2.57 ± 0.1
CPSP	1.58 ± 0.1	0.77 ± 0.2	1.44 ± 0.1	3.08 ± 0.05	7.35 ± 0.3	3.55 ± 0.03	2.91 ± 0.4	3.66 ± 0.04	5.69 ± 0.03	5.34 ± 0.6
HLAN	0.72 ± 0.0	0.33 ± 0.2	0.94 ± 0.0	1.12 ± 0.0	3.13 ± 0.0	1.64 ± 0.0	1.14 ± 0.0	1.03 ± 0.0	1.93 ± 0.0	1.88 ± 0.0
HCAM	0.94 ± 0.03	0.42 ± 0.2	0.73 ± 0.1	1.66 ± 0.1	4.62 ± 0.3	2.44 ± 0.4	2.09 ± 0.1	2.33 ± 0.2	3.36 ± 0.1	3.06 ± 0.0
HCAL	1.28 ± 0.0	0.58 ± 0.1	1.52 ± 0.1	2.44 ± 0.1	5.44 ± 0.2	2.77 ± 0.1	2.28 ± 0.1	2.68 ± 0.1	5.14 ± 0.2	4.73 ± 0.2

Met = metionina, Cis = cistina (¹No esencial), His = histidina, Tre = treonina, Arg = arginina, Val = valina, Fen = fenilalanina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lis = lisina. El origen y características principales de los ingredientes se muestran en la Tabla I. HPA = harina de sardina entera Monterrey, lote 2005 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPB = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). HPC = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPD = harina de atún, lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima. México). HDAC = Harina de desechos de almeja Catarina. CPSP = Concentrado proteico de solubles de pescado. HLAN = Harina de langostilla. HCAM = Harina de cabeza de camarón. HCAL = Harina de calamar.

Los resultados que se muestran en la Tabla IX, corresponden a la composición química proximal, energía bruta, perfil de aminoácidos e hidroestabilidad de los alimentos usados para evaluar los ingredientes de origen marino.

Tabla IX. Composición química proximal, contenido de energía, aminoácidos esenciales (g/100g materia seca) e hidroestabilidad (%) del alimento de referencia y los alimentos de prueba.

Nutrimento	Alimento de referencia	Alimento de prueba (70% alimento de referencia + 30% ingrediente de experimental)								
		HPA	HPB	HPC	HPD	HDAC	CPSP	HCAM	HCAL	HLAN
Materia seca	95.0±0.1	94.2±0.0	94.9±0.0	95.2±0.0	95.2±0.1	93.4±0.2	93.4±0.0	92.2±0.2	91.2±0.1	95.7±0.1
Proteína cruda	37.6±0.2	41.5±0.2	46.5±0.2	47.0±0.1	43.4±0.2	39.5±0.4	46.2±0.2	40.8±0.2	50.7±0.0	37.7±0.1
Extracto etéreo	9.6±0.3	9.8±0.3	10.8±0.1	9.3±0.1	12.6±0.4	12.4±0.0	14.6±0.0	10.2±0.2	9.97±0.0	7.5±0.1
Fibra cruda	0.13±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	1.1±0.0	0.2±0.0	1.5±0.2	0.8±0.2	4.9±0.2
Cenizas	10.7±0.0	12.3±0.1	11.8±0.0	12.0±0.1	12.1±0.5	14.5±0.0	9.8±0.0	15.3±0.1	9.9±0.1	17.4±0.1
ELN	42.2±0.4	36.1±0.2	30.8±0.3	31.6±0.6	31.8±0.7	32.5±0.3	29.1±0.3	32.2±0.2	28.6±0.1	32.4±0.3
EB kcal/g	4.2±0.0	4.4±0.0	4.6±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0	4.3±0.0	4.7±0.0	4.5±0.0	4.6±0.0	4.0±0.0
Aminoácido										
Lisina	2.52±0.1	2.38±0.1	2.63±0.1	4.19±0.1	3.10±0.0	2.99±0.1	3.93±0.1	3.46±0.1	3.70±0.6	2.85±0.1
Histidina	1.05±0.0	1.16±0.0	1.22±0.2	1.35±0.0	1.16±0.2	0.90±0.0	1.01±0.1	1.00±0.0	1.20±0.0	0.92±0.1
Arginina	2.23±0.0	3.08±0.0	3.02±0.2	3.24±0.1	2.76±0.0	2.93±0.0	3.27±0.0	2.88±0.1	3.95±0.1	2.61±0.2
Treonina	1.45±0.0	1.63±0.0	1.95±0.1	2.09±0.0	1.76±0.0	1.68±0.0	1.91±0.1	1.71±0.0	2.04±0.2	1.54±0.1
Metionina	0.71±0.0	0.76±0.0	0.94±0.1	0.89±0.0	0.84±0.0	0.84±0.0	0.89±0.0	0.64±0.0	0.91±0.1	0.65±0.0
Cistina*	0.37±0.0	0.45±0.1	0.43±0.0	0.58±0.1	0.39±0.0	0.44±0.0	0.50±0.0	0.37±0.0	0.54±0.0	0.39±0.0
Fenilalanina	1.76±0.0	1.79±0.1	2.44±0.1	2.63±0.0	2.24±0.0	2.09±0.1	2.44±0.2	2.41±0.1	2.30±0.7	2.07±0.1
Isoleucina	1.69±0.0	2.17±0.1	2.30±0.1	2.47±0.1	2.08±0.0	1.88±0.0	2.29±0.3	2.07±0.1	2.51±0.1	1.80±0.1
Leucina	2.76±0.0	3.21±0.1	3.64±0.1	4.02±0.1	3.34±0.0	2.95±0.0	3.57±0.1	3.31±0.1	4.03±0.5	2.79±0.2
Valina	1.89±0.0	2.18±0.0	2.56±0.1	2.76±0.1	2.28±0.0	2.10±0.1	2.45±0.2	2.29±0.0	2.44±0.2	2.04±0.1
Hidroestabilidad	97.5±0.2	95.7±0.4	97.5±0.6	96.6±0.3	96.8±0.4	97.6±0.3	89.6±0.5	93.9±0.2	94.8±0.4	93.6±0.3

HPA = harina de sardina entera Monterrey, lote 2005 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPB = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). HPC = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPD = harina de atún, lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima, México). HPD = Harina de atún, HDAC = Harina de desechos de almeja catarina, CPSP = Concentrado proteico solubles de pescado, HCAM = Harina de cabeza de camarón, HCAL = Harina de calamar, HLAN = Harina de langostilla, ELN = Extracto libre de nitrógeno, EB = Energía bruta, *No esencial. El origen y características principales de los ingredientes se muestran en la Tabla III.

I.1.1.1. Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y proteína (DAP) de ingredientes de origen marino

Los coeficientes de DAMS y DAP de los ingredientes de origen marino se presentan en la Tabla X. La DAMS fluctuó de 44.0% en la HPC a 102.0% en el CPSP ($P>0.05$), siendo la HCAL (95.0%) y el CPSP (102.0%) los ingredientes que tuvieron los valores más altos. La DAMS del grupo de las harinas de pescado variaron entre 44.0% y 76.2% con diferencias significativas ($P<0.05$) entre la HPA, y las HPB, HPC y HPD, siendo estas tres similares entre sí. En lo que se refiere a las harinas de crustáceos, la HLAN tuvo la menor digestibilidad (51.6%) en comparación con la HCAM (84.0%). El porcentaje de DAMS de la HDAC (67.2%) fue similar ($P>0.05$) al de la HPA (76.2%) pero inferior al del resto de los ingredientes. Por otra parte, la HCAL (95.0%) y la CPSP (102.0%) presentaron las DAMS más altas ($P<0.05$).

Respecto a la DAP, ésta fluctuó entre 62.7% en la HPC y 99.3% en el CPSP. La DAP de las harinas de pescado B (71.5%) y D (70.5%) fue similar, pero a la vez diferente ($P<0.05$) a la encontrada en las harinas A (84.9%) y C (62.7%). No se encontraron diferencias significativas entre la DAP de la HCAM (98.0%) y la HCAL (95.4%). La HLAN (84.6%) presentó una menor DAP ($P<0.05$) que la harina de cabeza de camarón (HCAM) (98.0%). La DAP del HDAC (86.8%) fue diferente ($P<0.05$) a todos los ingredientes de origen marino evaluados con excepción de la HPA (84.9%) y la HLAN (84.6%).

Tabla X. Digestibilidad aparente (% \pm desviación estándar) de materia seca (DAMS) y proteína (DAP) de ingredientes de origen marino.

Ingrediente	DAMS	DAP
Harina de pescado A (sardina 66.2% PC)	76.2 \pm 2.3 ^{bc}	84.9 \pm 1.3 ^b
Harina de pescado B (sardina 70.2% PC)	52.2 \pm 2.9 ^d	71.5 \pm 0.9 ^c
Harina de pescado C (sardina 69.8% PC)	44.0 \pm 1.5 ^d	62.7 \pm 4.7 ^d
Harina de pescado D (atún 60.5% PC)	52.6 \pm 3.8 ^d	70.5 \pm 1.5 ^c
Harina de desechos de almeja Catarina	67.2 \pm 2.7 ^c	86.8 \pm 1.4 ^b
Concentrado protéico soluble de pescado	102.0 \pm 1.2 ^a	99.3 \pm 0.2 ^a
Harina de langostilla	51.6 \pm 7.8 ^d	84.6 \pm 0.5 ^b
Harina de cabeza de camarón	84.0 \pm 1.6 ^b	98.0 \pm 2.5 ^a
Harina de calamar	95.0 \pm 2.0 ^a	95.4 \pm 3.4 ^a

HPA = harina de sardina entera Monterrey, lote 2005 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPB = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). HPC = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPD = harina de atún, lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima, México). El origen y características principales de los ingredientes se muestran en la Tabla III. Medias dentro de cada columna con diferentes literales son significativamente distintas ($P < 0.05$).

I.1.1.2 Digestibilidad aparente de aminoácidos (DAAA) de ingredientes de origen marino

Los coeficientes de DAAA de los nueve ingredientes se muestran en la Tabla XI, en general el DAAA fue acorde con la DAP, para el cálculo del DAP en las HLAN y HCAN los porcentajes de PC fueron corregidos por el contenido de nitrógeno en la quitina sumando la cantidad de aminoácidos esenciales y no esenciales analizados en laboratorio.

La DAAA de los nueve ingredientes fluctuaron de 61.2% y 61.4% para Lis e Ile en la HPB y la HLAN, respectivamente, hasta 105.4% de la Lis en la HCAM. En promedio, las harinas HPB, HPC y HPD tuvieron coeficientes cercanos a 72%. Los menores valores que se encontraron ($P>0.05$) fueron para Fen y Lis en la HPB; Fen en la HPC; Cis, Tre, Fen en la HPD, y Ile en la HLAN. La DAAA de Cis en la HPB, Tre y Fen en la HPC, Tre y Fen en la HPD estuvieron cercanos a 68% y no difirieron entre ellos ($P>0.05$). La DAAA en la HPA, la HDAC y la HLAN varió entre 83 y 89%.

El CPSP, la HCAM y la HCAL tuvieron los valores más elevados en la DAAA (98, 96, y 92%, respectivamente). En particular, la Cis (100.1%), la His (100.1%) y la Lis (100.3%) en el CPSP y en la HCAM (105.4%) fueron los más altos. Otros valores elevados en la digestibilidad (96.2-100.1%) de aminoácidos ($P>0.05$) fueron encontrados en la HDAC (His), la HPA (His), la HLAN (Met), el CPSP (Met, Cis, His, Fen e Ile), la HCAM (His, Arg y Leu) y la HCAL (Arg).

Se detectaron diferencias significativas entre aminoácidos, donde el coeficiente de utilización digestiva de la metionina varió de 69.4% en la HPC a 98.2% en el CPSP. Para el caso de la cistina se presentaron las mayores diferencias entre la HPA (61.5%) y el CPSP (100.1%). La Tre mostró la menor digestibilidad en la HDAC, al igual que de Fen en la HPA, la FMB, la HPC, la HCAM, y la HCAL, así como la Lis y la Ile en la HPC y la HLAN.

Tabla XI. Digestibilidad aparente de aminoácidos esenciales (% \pm desviación estándar) de ingredientes de origen marino para juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Ingrediente	Met	Cis ¹	His	Tre	Arg	Val	Fen	Ile	Leu	Lis
HPA	86.2 ^c	89.2 ^{bc}	96.6 ^a	86.4 ^b	98.8 ^a	86.9 ^c	79.4 ^d	92.1 ^b	92.4 ^b	86.2 ^c
	± 4.2	± 1.5	± 1.7	± 2.7	± 1.7	± 1.8	± 2.3	± 2.9	± 1.2	± 0.4
HPB	77.3 ^d	68.7 ^d	81.2 ^d	78.9 ^d	81.9 ^b	73.9 ^d	64.9 ^e	75.2 ^d	72.1 ^d	61.4 ^e
	± 2.9	± 2.6	± 3.2	± 4.8	± 0.7	± 1.1	± 0.8	± 0.5	± 0.7	± 4.1
HPC	69.4 ^d	69.7 ^d	83.5 ^{cd}	66.8 ^e	78.2 ^b	69.2 ^d	64.7 ^e	69.6 ^d	72.1 ^d	80.4 ^d
	± 1.3	± 0.9	± 1.6	± 2.4	± 1.5	± 0.6	± 0.7	± 0.8	± 3.7	± 1.9
HPD	74.9 ^d	61.5 ^e	84.0 ^{cd}	65.2 ^e	79.3 ^b	69.5 ^e	65.1 ^e	70.4 ^e	73.5 ^d	78.1 ^d
	± 4.7	± 2.0	± 0.6	± 0.8	± 1.9	± 2.2	± 1.3	± 0.9	± 0.4	± 0.7
HDAC	89.3 ^{bc}	87.2 ^c	97.5 ^a	82.5 ^c	94.7 ^a	85.1 ^c	84.9 ^c	83.2 ^c	86.0 ^c	89.0 ^c
	± 2.3	± 1.7	± 2.8	± 0.6	± 0.7	± 1.5	± 1.0	± 1.0	± 0.5	± 0.6
CPSP	98.2 ^a	100.1 ^a	100.1 ^a	95.4 ^a	96.4 ^a	97.1 ^a	96.2 ^a	98.2 ^a	99.3 ^a	102.3 ^a
	± 2.5	± 0.5	± 1.4	± 0.4	± 3.1	± 0.2	± 0.0	± 0.7	± 0.1	± 0.1
HLAN	97.0 ^a	90.0 ^{bc}	88.4 ^{bc}	76.0 ^d	95.7 ^a	86.1 ^c	75.4 ^{cde}	61.2 ^f	71.8 ^d	87.3 ^c
	± 2.2	± 4.3	± 0.1	± 6.7	± 1.4	± 2.2	± 1.6	± 2.6	± 3.6	± 2.4
HCAM	95.6 ^{ab}	93.7 ^b	97.8 ^a	93.7 ^a	98.3 ^a	94.7 ^{ab}	89.8 ^b	93.3 ^b	97.4 ^a	105.4 ^a
	± 0.3	± 0.0	± 0.1	± 1.2	± 0.8	± 1.7	± 1.9	± 2.9	± 4.0	± 1.1
HCAL	90.4 ^{bc}	92.7 ^b	97.1 ^a	87.1 ^b	99.5 ^a	90.7 ^b	85.3 ^{bc}	85.8 ^c	94.2 ^b	96.4 ^b
	± 1.3	± 1.4	± 0.1	± 1.8	± 0.8	± 3.6	± 0.1	± 4.4	± 1.5	± 2.0

Met = metionina, Cis = cistina (¹No esencial), His = histidina, Tre = treonina, Arg = arginina, Val = valina, Fen = fenilalanina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lis = lisina. HPA = harina de sardina entera Monterrey, lote 2005 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPB = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). HPC = harina de sardina entera Monterrey, lote 2006 (Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). HPD = harina de atún, lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima, México). HDAC = Harina de desechos de almeja catarina. CPSP = Concentrado proteico solubles de pescado. HLAN = Harina de langostilla. HCAM = Harina de cabeza de camarón. HCAL = Harina de calamar. Medias dentro de cada columna con diferentes literales son significativamente distintas ($P < 0.05$). El origen y características principales de los ingredientes se muestran en la Tabla III.

I.1.2. Ingredientes de origen terrestre

I.1.2.1. Composición química proximal, energía bruta y aminoácidos contenidos en los ingredientes de origen terrestre

La composición proximal y el contenido de energía bruta expresadas en base seca de los ocho ingredientes alimenticios de origen terrestre se muestran en la Tabla XII. La concentración de proteína cruda encontrada en los ingredientes fluctuó entre 8.4% en la harina de sorgo y 91.2% en la caseína; seguidos del GLM y el GLT con 72.3% y 83.2%; mientras que la PSOY, la HSPA y la HSPP tuvieron valores de 52.9%, 57.3% y 65.0%, respectivamente. Los dos cereales analizados (HSOR, 8.4%; HTRI, 12.7%) mostraron los valores más bajos de proteína.

Referente al contenido de extracto etéreo, éste fue mayor en los dos ingredientes de origen animal (HSPA, 12.4%; HSPP, 9.5%), la HSOR resultó con un mayor nivel (3.9%) de extracto etéreo que lo encontrado en el HT (0.74%); el GLM y la PSOY presentaron valores similares (2.5% y 2.6%), el GLT mostró un 0.74% y la CASE un 0.03%, siendo éstos los más bajos.

En el caso de la fibra cruda, la HSOR y la PSOY resultaron con los valores más altos (1.4% y 2.0%), el resto de los ingredientes tuvieron valores menores a 0.81%.

Por otra parte, se encontró el mayor contenido de cenizas en las dos harinas de origen animal (HSPP, 25.1% y HSPA 13.7%); la PSOY presentó un valor intermedio (6.9%); mientras que la HSOR y el GLM tuvieron contenidos bajos y similares entre sí (1.62% y 1.49%). El GLT, el HTRI y la CASE tuvieron menos de 0.8% de cenizas.

Los valores de energía más altos se encontraron en el gluten de maíz y el gluten de trigo, mientras que la energía determinada en HSOR, PSOY, HSPP y HSPA fluctuó entre 4.0 y 4.7 kcal/g. Los valores más bajos de energía fueron detectados en la HTRI y la CASE, con 3.8 kcal/g.

Tabla XII. Composición proximal (g/100g de materia seca \pm desviación estándar) y contenido de energía bruta (kcal g⁻¹) de los ingredientes de origen terrestre evaluados en el experimento de digestibilidad.

Ingrediente	Materia seca	Proteína cruda	Extracto etéreo	Fibra cruda	Cenizas	ELN ¹	Energía bruta	Razón P/E mg PC/kcal
CASE	94.1	91.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	7.3	3.8 ± 0.010	240.0
HSPA	97.2	65.0 ± 0.2	12.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0	13.7 ± 0.0	8.8	4.7 ± 0.015	18.3
HSPP	97.1	57.3 ± 0.1	9.5 ± 0.4	0.5 ± 0.0	25.1 ± 0.0	7.6	4.3 ± 0.007	133.2
HTRI	92.2	12.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.4	85.9	3.8 ± 0.005	33.4
HSOR	92.2	8.4 ± 0.1	3.9 ± 0.0	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.0	84.7	4.0 ± 0.005	21.0
PSOY	94.0	52.9 ± 0.0	2.6 ± 0.1	2.0 ± 0.15	6.95 ± 0.04	35.5	4.3 ± 0.005	123.0
GLM	93.5	72.3 ± 0.2	2.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.5 ± 0.0	23.2	5.3 ± 0.001	136.4
GLT	94.4	83.2 ± 0.2	1.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	14.2	5.0 ± 0.004	166.4

¹ Extracto libre de nitrógeno = 100% - (% proteína cruda + % extracto etéreo + % fibra cruda + % cenizas). P/E= Proteína/energía, PC = proteína cruda. CASE = caseína, HSPA = harina de subproductos avícolas, HSPP = harina de subproductos porcícolas, HTRI = harina de trigo, HSOR = harina de sorgo, PSOY = pasta de soya, GLM = gluten de maíz, GLT = gluten de trigo. En la Tabla IV se muestran las características y el origen de los ingredientes.

La composición de aminoácidos esenciales de los ingredientes se muestra en la Tabla XIII.

Los valores más altos se encontraron en Leu (8.3%) y Arg (5.7%) en la caseína y Leu

(5.3%) en el GLT; mientras que las cantidades más bajas fueron detectadas en los aminoácidos azufrados (Met y Cis), tanto en la harina de trigo como en la de sorgo.

Tabla XIII. Perfil de aminoácidos esenciales (g/100g de alimento \pm D.E.) de los ingredientes de origen terrestre utilizados en la prueba de digestibilidad.

Ingredientes	Met	Cis	His	Tre	Arg	Val	Fen	Ile	Leu	Lis
CASE	2.67 \pm 0.43	0.54 \pm 0.05	2.65 \pm 0.13	3.60 \pm 0.15	3.08 \pm 0.16	5.75 \pm 0.25	4.65 \pm 0.16	4.75 \pm 0.13	8.26 \pm 0.41	6.18 \pm 1.68
HSPA	1.24 \pm 0.02	0.53 \pm 0.01	1.27 \pm 0.14	2.59 \pm 0.14	4.71 \pm 0.29	2.72 \pm 0.14	2.10 \pm 0.10	2.62 \pm 0.14	4.14 \pm 0.25	2.93 \pm 0.81
HSPP	0.77 \pm 0.02	0.45 \pm 0.05	0.98 \pm 0.06	1.66 \pm 0.02	4.10 \pm 0.01	2.44 \pm 0.31	1.87 \pm 0.11	1.85 \pm 0.02	3.31 \pm 0.01	2.14 \pm 0.56
HTRI	0.18 \pm 0.01	0.23 \pm 0.06	0.28 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.49 \pm 0.01	0.57 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	0.77 \pm 0.00	0.43 \pm 0.00
HSOR	0.14 \pm 1.48	0.14 \pm 0.04	0.17 \pm 1.47	0.25 \pm 2.11	0.43 \pm 3.59	0.47 \pm 12.1	0.47 \pm 21.3	0.34 \pm 9.65	1.15 \pm 54.0	0.61 \pm 0.54
PSOY	0.59 \pm 0.00	0.55 \pm 0.07	1.36 \pm 0.08	1.76 \pm 0.13	3.47 \pm 0.19	2.26 \pm 0.18	2.47 \pm 0.23	2.17 \pm 0.19	3.58 \pm 0.33	2.73 \pm 0.75
GLM	2.04 \pm 0.05	1.08 \pm 1.18	1.32 \pm 0.03	1.98 \pm 0.01	1.94 \pm 0.01	2.87 \pm 0.00	4.08 \pm 0.02	2.76 \pm 0.03	9.83 \pm 0.07	1.18 \pm 0.06
GLT	1.25 \pm 0.02	1.61 \pm 0.04	1.61 \pm 0.09	1.93 \pm 0.07	2.58 \pm 0.08	3.17 \pm 0.11	4.32 \pm 0.22	3.16 \pm 0.14	5.28 \pm 0.20	1.23 \pm 0.16

Met = metionina, Cis = cistina (no esencial), His = histidina, Tre = treonina, Arg = arginina, Val = valina, Fen = fenilalanina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lis = lisina. CASE = Caseína. HSPA = Harina de subproductos avícolas (pollos y pavos). HSPP = Harina de subproductos porcícolas. HTRI = Harina de trigo. HSOR = Harina de sorgo. PSOY = Pasta de soya. GLM = Gluten de maíz. GLT = Gluten de trigo. El origen y las características principales de los ingredientes se pueden consultar en la Tabla IV. En cada columna, medias con literales distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

La composición química proximal, el contenido de energía bruta y amino ácidos y la hidroestabilidad, del alimento de referencia y los alimentos de prueba se muestran en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Composición química proximal, contenido de energía bruta, perfil de aminoácidos esenciales (g/100g materia seca) e hidroestabilidad (%) del alimento de referencia y los alimentos de prueba en los que se incorporaron los ingredientes de origen terrestre.

Nutrimentos	Alimento de referencia	Alimentos de prueba (70% alimento de referencia + 30% ingredientes experimentales)							
		CASE	HSPA	HSPP	HTRI	HSOR	PSOY	GLM	GLT
Materia seca	95.0±0.09	94.4±0.04	93.7±0.11	95.2±0.19	92.5±0.15	92.2±0.14	95.0±0.09	95.7±0.03	93.7±0.17
Proteína cruda	37.6±0.20	51.7±0.35	45.3±0.16	42.7±0.11	28.5±0.08	28.0±0.08	40.5±0.03	47.0±0.19	49.9±0.25
Extracto etéreo	9.6±0.31	8.4±0.01	11.9±0.17	12.0±0.36	8.7±0.07	8.6±0.03	9.4±0.08	9.5±0.02	8.7±0.04
Fibra cruda	0.13±0.01	0.9±0.09	0.4±0.01	0.6±0.04	0.6±0.03	1.2±0.16	0.9±0.15	0.8±0.04	0.1±0.02
Cenizas	10.7±0.01	8.1±0.07	11.8±0.01	15.0±0.04	7.8±0.4	8.1±0.00	9.7±0.04	8.1±0.02	7.8±0.02
ELN	42.2±0.43	30.9±0.19	30.5±0.22	29.7±0.61	54.4±0.34	54.2±0.23	39.4±0.35	34.5±0.23	33.4±0.41
EB (kcal/g)	4.2±0.01	3.8±0.01	4.5±0.01	4.4±0.07	4.4±0.05	4.4±0.05	4.4±0.05	4.7±0.01	4.6±0.05
Aminoácidos									
Lisina	2.52±0.11	2.50±0.10	3.38±0.22	1.95±0.81	1.48±0.17	1.80±0.43	2.38±0.96	1.59±0.22	1.82±0.63
Histidina	1.05±0.01	1.32±0.14	1.02±0.05	0.95±0.48	0.77±0.04	0.80±0.08	1.09±0.01	1.14±0.02	1.08±0.11
Arginina	2.23±0.03	2.83±0.01	3.29±0.08	3.42±1.01	1.39±0.04	1.53±0.03	3.08±0.04	2.72±0.09	2.57±0.17
Treonina	1.45±0.02	1.93±0.00	1.85±0.09	1.89±0.17	1.16±0.03	1.15±0.01	1.63±0.24	1.89±0.10	1.57±0.10
Metionina	0.71±0.02	1.26±0.06	0.81±0.07	0.75±0.13	0.51±0.12	0.49±0.00	0.69±0.01	0.80±0.00	0.86±0.05
Cistina*	0.37±0.01	0.43±0.10	0.41±0.03	0.38±0.08	0.31±0.07	0.29±0.03	0.39±0.04	0.44±0.05	0.74±0.05
Fenilalanina	1.76±0.01	2.34±0.10	2.43±0.05	1.84±0.44	1.29±0.02	1.63±0.00	1.79±0.12	2.39±0.08	2.29±0.09
Isoleucina	1.69±0.01	2.88±0.01	2.14±0.07	2.07±0.23	1.49±0.03	1.37±0.01	2.17±0.13	2.46±0.09	2.41±0.02
Leucina	2.76±0.04	4.28±0.05	3.55±0.17	3.12±0.79	2.19±0.02	2.35±0.00	3.21±0.09	5.45±0.28	3.48±0.07
Valina	1.89±0.03	2.91±0.00	2.40±0.05	2.11±0.28	1.42±0.03	1.53±0.01	2.18±0.05	2.24±0.08	2.16±0.06
Hidroestabilidad	96.1±0.21	97.3±0.56	97.3±0.32	96.5±0.22	96.2±0.66	95.5±0.79	93.4±0.59	96.3±0.38	98.9±0.10

CASE = Caseína. HSPA = Harina de subproductos avícolas (pollos y pavos). HSPP = Harina de subproductos porcícolas. HTRI = Harina de trigo. HSOR = Harina de sorgo. PSOY = Pasta de soya. GLM = Gluten de maíz. GLT = Gluten de trigo. EB = Energía bruta. ELN = Extracto libre de nitrógeno. *No esencial.

I.1.2.2. Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y de proteína (DAP) de ingredientes de origen terrestre

La DAMS y la DAP de los ocho ingredientes se muestran en la Tabla XV. En el caso de la DAMS, el menor y el mayor valor se encontraron en la HSPP (68.2%) y el GLT (109.2%). La digestibilidad de materia seca del GLT fue significativamente mayor a la de la CASE (97.3%), y a su vez la de ésta última fue superior a la de los demás ingredientes ($P < 0.05$). La HSPP y el HTRI mostraron coeficientes similares con 89.0 y 89.4%, respectivamente ($P > 0.05$).

El GLM, la HSOR y la PSOY tuvieron valores en la DAMS similares entre sí (82.8, 82.4 y 85.4%, respectivamente), mientras que DAMS de la PSOY no difirió respecto a la HSPA y la HTRI ($P > 0.05$).

En lo que corresponde a digestibilidad de proteína, el GLT mostró el valor más alto (103.1%), siendo similar a la HTRI, la PSOY y la CASE (100.3, 100.0 y 99.9%, respectivamente). Estos valores fueron significativamente mayores a los de la HSPA, el GLM, la HSPP y la HSOR (88.3, 81.2, 75.8 y 69.9%, respectivamente), siendo a la vez éstos últimos diferentes entre sí ($P < 0.05$).

Tabla XV. Digestibilidad aparente (% \pm desviación estándar) de materia seca (DAMS) y proteína (DAP) de ingredientes de origen terrestre.

Ingrediente	DAMS	DAP
Caseína	97.3 \pm 3.0 ^b	99.9 \pm .5 ^a
Harina de subproductos avícolas	89.0 \pm 3.8 ^c	88.3 \pm 0.5 ^b
Harina de subproductos porcinos	68.2 \pm 2.4 ^e	75.8 \pm 0.8 ^d
Harina de trigo	89.4 \pm 1.8 ^c	100.3 \pm 2.2 ^a
Harina de sorgo	82.4 \pm 2.7 ^d	69.9 \pm 3.4 ^e
Pasta de soya	85.4 \pm 1.7 ^{cd}	100.0 \pm 0.6 ^a
Gluten de maíz	82.8 \pm 1.6 ^d	81.2 \pm 0.4 ^c
Gluten de trigo	109.2 \pm 3.8 ^a	103.1 \pm 0.7 ^a

El origen y características principales de los ingredientes se pueden consultar en la Tabla IV. Medias dentro de cada columna con diferentes literales son significativamente distintas ($P < 0.05$).

I.1.2.3. Digestibilidad aparente de aminoácidos (DAAA) de ingredientes de origen terrestre

Los coeficientes de DAAA se muestran en la Tabla XVI. Éstos fluctuaron entre 61.6% para His en la HSOR y 108.4% para Arg en el GLT. Los menores coeficientes se encontraron para Met, His, Tre, Val y Lis en la HS (61.6 a 71.6%). Valores entre 70 y 76% se obtuvieron para Fen (GLM), Cis, Arg e Ile en la HSOR; Cis y Val en la HSPP; y Leu y Lis en el GLM.

Valores entre 80 y 83% se observaron para Val en el GLM; His en la HSPA; His, Ile y Leu en la HSPP; Fen y Leu en la HSOR; Tre en el GLM; Cis en la HSPA; Tre y Arg en la HSPP y Lis en la HTRI. Coeficientes de DAAA alrededor de 88%, se encontraron para

Met, Cis e Ile en el GLM; Tre, Val, Fen, Ile y Leu en la HSPA; Fen para la PSOY y Met en la HSPP. Valores cercanos a 93% se detectaron para His en la HSPA y Tre en la PSOY.

Coeficientes entre 93.5 y 99.7% se obtuvieron para Tre y Leu en la CASE; Arg en el GLM; Arg y Lis en la HSPA; Met, Cis, Val, Ile y Lis en la PSOY; Tre y Fen en el GLT, y Cis, His, Arg, Val, Fen e Ile en la HT. Valores cercanos al 100% fueron detectados para Met, Cis, His, Arg, Val, Fen, Ile y Lis en la CASE; His, Arg y Leu en la PSOY; Met, Cis, His, Val, Ile, Leu y Lis en el GLT, y Met y Tre en la HTRI.

Tabla XVI. Digestibilidad aparente (% \pm desviación estándar) de los aminoácidos esenciales de ingredientes de origen terrestre.

Ingrediente	Met	Cis	His	Tre	Arg	Val	Fen	Ile	Leu	Lis
CASE	100.0 ^a	100.1 ^a	102.4 ^a	99.7 ^a	101.6 ^a	100.4 ^a	100.3 ^a	100.6 ^a	97.8 ^{ab}	99.7 ^a
	± 1.1	± 1.6	± 1.9	± 3.1	± 1.0	± 1.5	± 3.1	± 3.9	± 3.0	± 0.3
HSPA	93.6 ^{ab}	85.0 ^b	80.8 ^c	84.9 ^c	94.0 ^b	89.7 ^b	86.6 ^b	87.4 ^{bc}	89.0 ^{bc}	93.5 ^b
	± 0.0	± 1.0	± 5.0	± 1.7	± 0.9	± 1.6	± 1.3	± 1.9	± 0.6	± 1.2
HSPP	87.8 ^b	72.5 ^c	80.0 ^c	79.4 ^c	82.6 ^c	74.0 ^d	66.8 ^d	81.5 ^c	78.2 ^{cd}	66.2 ^e
	± 1.7	± 3.6	± 3.2	± 2.3	± 1.7	± 1.1	± 2.5	± 2.3	± 3.3	± 7.8
HTRI	100.1 ^a	94.9 ^{ab}	94.6 ^b	102.2 ^a	94.8 ^{ab}	97.8 ^{ab}	97.6 ^a	92.4 ^b	91.8 ^b	82.4 ^c
	± 2.1	± 1.4	± 6.2	± 6.5	± 5.1	± 4.5	± 4.0	± 0.0	± 1.0	± 2.0
HSOR	71.6 ^c	73.2 ^c	61.6 ^d	68.1 ^d	74.4 ^d	62.8 ^c	81.5 ^b	75.3 ^d	80.4 ^c	66.2 ^e
	± 2.6	± 5.7	± 19.6	± 4.7	± 0.5	± 1.6	± 2.9	± 0.7	± 1.4	± 7.1
PSOY	97.9 ^a	94.9 ^{ab}	101.0 ^a	92.8 ^b	103.6 ^a	99.3 ^a	87.2 ^b	99.5 ^{ab}	100.3 ^a	96.3 ^{ab}
	± 4.1	± 4.2	± 1.8	± 2.1	± 0.3	± 2.2	± 0.3	± 2.0	± 0.4	± 2.5
GLMA	88.3 ^b	87.6 ^b	92.9 ^b	83.4 ^c	96.7 ^{ab}	81.5 ^c	70.7 ^c	84.9 ^{bc}	75.9 ^d	75.3 ^d
	± 0.3	± 0.6	± 5.8	± 3.8	± 4.3	± 2.9	± 3.1	± 3.9	± 1.4	± 5.3
GLTR	104.1 ^a	101.7 ^a	103.4 ^a	98.9 ^a	108.4 ^a	99.8 ^a	98.9 ^a	103.1 ^a	103.6 ^a	101.2 ^a
	± 3.6	± 0.4	± 1.4	± 0.6	± 0.6	± 0.7	± 1.0	± 0.6	± 0.4	± 3.2

Met = metionina, Cis = cistina (No esencial). His = histidina, Tre = treonina, Arg = arginina, Val = valina, Fen = fenilalanina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lis = lisina. CASE = Caseína. HSPA = Harina de subproductos avícolas (pollos y pavos). HSPP = Harina de subproductos porcícolas. HTRI = Harina de trigo. HSOR = Harina de sorgo. PSOY = Pasta de soya. GLM = Gluten de maíz. GLT = Gluten de trigo. El origen y las características principales de los ingredientes se pueden consultar en la Tabla IV. Medias dentro de cada columna con diferentes literales son significativamente distintas ($P < 0.05$).

Experimento II. Determinación del efecto del nivel de inclusión de proteína digerible y metionina en el alimento sobre el crecimiento y utilización del alimento en juveniles de camarón *L. vannamei*

II.1. Análisis químico proximal y contenido de energía en los alimentos

En la Tabla XVII se pueden observar los resultados de la composición química proximal y de energía de los 20 alimentos usados en el bioensayo de crecimiento para evaluar el efecto del uso de cuatro niveles de PD con cinco niveles metionina en el crecimiento del camarón.

Los resultados obtenidos del análisis químico proximal son congruentes con la composición química calculada o esperada en cada fracción analizada, ya que éstas son el producto de la combinación de los distintos ingredientes usados durante el proceso de formulación. Los valores que se observan entre la cantidad de proteína digestible formulada (18, 23, 28 y 33%) que se aprecia en la primera columna, y la proteína cruda (PC) analizada que se muestra en la tercera columna, son distintos en virtud de que los primeros están expresados en base húmeda y los segundos en base seca. Uno de los cambios importantes ocurre cuando se incrementa la cantidad de trigo en los alimentos con menos proteína, siendo los tres primeros alimentos de 64.3, 59.6 y 45% en los alimentos con 18, 23 y 28% de PD, respectivamente; estas cantidades representan 52, 49 y 32% más de trigo en los tres alimentos con menos proteína, que el adicionado al alimento con 33% de PD.

Tabla XVII. Composición química proximal (g/100 g de materia seca, excepto humedad, \pm desviación estándar) y contenido de energía bruta de los alimentos empleados en el bioensayo de crecimiento.

Alimento %PD+Met%	H (%)	PC (%)	EE (%)	FC (%)	C (%)	ELN (%)	EB (kcal/g)
18+0.25	11.6 \pm 0.1	20.1 \pm 0.3	8.8 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	65.2	4.61 \pm 0.02
18+0.40	11.6 \pm 0.4	19.4 \pm 0.4	9.2 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.0	65.3	4.66 \pm 0.02
18+0.55	10.2 \pm 0.4	20.1 \pm 0.3	8.9 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.0	67.3	4.78 \pm 0.02
18+0.70	9.4 \pm 0.2	20.1 \pm 0.3	9.3 \pm 0.0	1.0 \pm 0.2	4.9 \pm 0.0	64.6	4.61 \pm 0.02
18+0.85	9.1 \pm 0.2	19.7 \pm 0.2	9.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	4.9 \pm 0.0	65.4	4.63 \pm 0.01
23+0.35	9.8 \pm 0.1	25.2 \pm 0.0	8.9 \pm 0.0	0.9 \pm 0.2	4.8 \pm 0.0	60.3	4.54 \pm 0.03
23+0.50	8.6 \pm 0.3	25.6 \pm 0.6	8.8 \pm 0.0	0.9 \pm 0.2	4.8 \pm 0.0	59.8	4.63 \pm 0.02
23+0.65	9.7 \pm 0.4	25.5 \pm 0.6	8.7 \pm 0.0	0.9 \pm 0.2	4.8 \pm 0.0	60.1	4.77 \pm 0.03
23+0.80	10.2 \pm 1.0	25.6 \pm 0.5	9.1 \pm 0.0	1.0 \pm 0.2	4.7 \pm 0.0	59.5	4.82 \pm 0.02
23+0.95	11.3 \pm 0.1	25.9 \pm 0.1	9.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	4.6 \pm 0.1	59.2	4.83 \pm 0.01
28+0.45	9.3 \pm 0.2	32.0 \pm 0.5	9.3 \pm 0.0	1.6 \pm 0.3	7.7 \pm 0.0	49.3	4.73 \pm 0.05
28+0.60	9.3 \pm 0.3	31.6 \pm 0.2	9.4 \pm 0.0	1.6 \pm 0.0	7.7 \pm 0.0	49.7	4.61 \pm 0.02
28+0.75	8.4 \pm 0.2	31.0 \pm 0.0	9.1 \pm 1.0	2.2 \pm 0.3	7.4 \pm 0.3	50.3	4.78 \pm 0.02
28+0.90	9.4 \pm 0.4	31.1 \pm 0.1	9.4 \pm 0.0	2.4 \pm 0.1	7.7 \pm 0.0	49.4	4.70 \pm 0.03
28+1.05	10.0 \pm 0.4	31.2 \pm 0.2	9.5 \pm 0.0	1.7 \pm 0.3	7.4 \pm 0.1	50.2	4.64 \pm 0.02
33+0.55	8.8 \pm 0.6	36.8 \pm 0.2	9.9 \pm 0.0	3.3 \pm 0.1	10.6 \pm 0.0	39.4	4.75 \pm 0.02
33+0.70	10.0 \pm 0.5	37.2 \pm 0.4	9.8 \pm 0.2	3.3 \pm 0.4	10.6 \pm 0.1	39.0	4.61 \pm 0.01
33+0.85	10.1 \pm 0.3	36.9 \pm 0.2	9.7 \pm 0.0	2.8 \pm 0.1	10.5 \pm 0.1	39.9	4.68 \pm 0.03
33+1.00	9.9 \pm 0.4	37.1 \pm 0.3	9.8 \pm 0.0	3.2 \pm 0.0	10.6 \pm 0.0	39.4	4.68 \pm 0.02
33+1.15	9.5 \pm 0.3	36.5 \pm 0.6	9.7 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0	10.4 \pm 0.0	40.6	4.51 \pm 0.01

PD = % de proteína digerible calculada+% Met (Metionina total calculada). H = Humedad, PC = Proteína cruda, EE = Extracto etéreo, FC = Fibra cruda, C = Cenizas, ELN = Extracto libre de nitrógeno= 100% - (% proteína cruda+ % extracto etéreo + % fibra cruda + % cenizas), EB = Energía bruta.

II.2. Bioensayo de crecimiento

Los resultados obtenidos en las variables de peso vivo final, consumo de alimento, conversión alimenticia, relación de eficiencia proteica, y supervivencia, que se obtuvieron en los camarones después de 44 días de experimentación se muestran en la Tabla XVIII.

Los camarones alimentados con los alimentos con 18 y 23 % de PD mostraron el menor crecimiento en peso, con promedios para cada grupo de 1.31 g y 1.23 g, respectivamente, sin diferencia significativa entre sí. En lo que corresponde a los camarones que recibieron los alimentos con 28 y 33% de PD, se encontró un peso promedio significativamente mayor en los camarones alimentados con 33% de PD (5.02 g) que en aquellos alimentados con 28% de PD (2.48 g). El peso promedio alcanzado por los animales alimentados con el nivel de 33% de PD representó una ganancia adicional de 383%, 408% y 202% comparado con los de los camarones alimentados con 18, 23 y 28% de PD, en ese mismo orden. A su vez, los camarones alimentados con 28% de PD tuvieron un peso promedio final significativamente mayor que aquellos alimentados con 18 y 23% de PD.

Para el caso del consumo aparente de alimento, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de alimentos con 18 y 23% de PD, que tuvieron promedios de 3.34 y 2.99 g, respectivamente, mientras que dichos valores fueron significativamente inferiores a los encontrados con los grupos 28 y 33% de PD (5.35 y 10.50 g, respectivamente). Además, el grupo con 33% de PD presentó un consumo aparente de alimento significativamente mayor al registrado con 28% de PD.

La conversión alimenticia fue similar entre los alimentos con niveles de 18 y 23% de PD (2.55 y 2.45, respectivamente), siendo estos dos significativamente mayores a los valores encontrados con los alimentos con 28 y 33% de PD (2.14 y 2.08), que no difirieron entre sí.

Tabla XVIII. Peso final (PF), consumo aparente de alimento (CAA), conversión alimenticia (CA), eficiencia proteica (EP) y supervivencia (SUP) de los camarones que recibieron los alimentos experimentales.

PD ¹ (%)	Met ¹ (%)	PF (g)	CAA (g/día)	CA	EP	SUP ² (%)
18.0	0.25	1.25±0.22	0.069±0.00	2.45±0.15	2.05±0.21	93.3±5.8
	0.40	1.44±0.25	0.080±0.01	2.44±0.18	2.16±0.15	86.7±11.5
	0.55	1.33±0.22	0.080±0.01	2.62±0.15	1.90±0.10	86.7±5.8
	0.70	1.24±0.20	0.068±0.00	2.41±0.07	2.06±0.06	93.3±5.8
	0.85	1.30±0.28	0.083±0.01	2.82±0.32	1.83±0.21	93.3±5.8
		1.31±0.09^A	0.076±0.00^A	2.55±0.06^A	1.96±0.04^A	91.3±7.4^A
23.0	0.35	1.10±0.20	0.066±0.00	2.58±0.32	1.54±0.19	76.7±5.8
	0.50	1.21±0.20	0.063±0.01	2.30±0.22	1.69±0.15	93.3±5.8
	0.65	1.30±0.26	0.073±0.01	2.45±0.27	1.60±0.20	83.3±5.8
	0.80	1.40±0.29	0.072±0.00	2.27±0.25	1.73±0.18	100.0±0.0
	0.95	1.13±0.19	0.066±0.01	2.57±0.12	1.51±0.07	93.3±5.8
		1.23±0.09^A	0.068±0.00^A	2.45±0.06^A	1.61±0.04^A	89.3±11.0^A
28.0	0.45	2.30±0.55 ^c	0.110±0.02 ^c	2.01±0.11 ^b	1.57±0.09 ^a	86.7±11.5
	0.60	2.52±0.46 ^b	0.120±0.02 ^b	2.10±0.31 ^b	1.53±0.22 ^a	96.7±5.8
	0.75	2.13±0.38 ^c	0.094±0.01 ^c	1.93±0.14 ^b	1.68±0.13 ^a	93.3±5.8
	0.90	2.54±0.48 ^b	0.145±0.03 ^a	2.51±0.42 ^a	1.31±0.20 ^b	96.7±5.8
	1.05	2.89±0.66 ^a	0.141±0.00 ^a	2.15±0.13 ^b	1.50±0.09 ^a	96.7±5.8
		2.48±0.09^B	0.121±0.00^B	2.14±0.06^B	1.51±0.04^B	95.8±7.4^A
33.0	0.55	4.84±0.77 ^{bc}	0.214±0.02 ^b	1.94±0.05 ^b	1.41±0.04 ^a	86.7±11.5
	0.70	4.75±0.71 ^c	0.225±0.01 ^b	2.08±0.29 ^b	1.29±0.14 ^a	100.0±0.0
	0.85	5.21±0.75 ^a	0.228±0.02 ^b	1.93±0.10 ^b	1.41±0.08 ^a	93.3±8.2
	1.00	5.21±0.77 ^a	0.295±0.03 ^a	2.49±0.28 ^a	1.08±0.12 ^b	90.0±10.0
	1.15	5.10±0.81 ^a	0.231±0.02 ^b	1.99±0.16 ^b	1.38±0.10 ^a	90.0±10.0
		5.02±0.09^C	0.238±0.00^C	2.08±0.06^B	1.32±0.04^B	91.3±9.1^A

¹Cantidades en base húmeda. PD = proteína digerible. Met = Metionina total. No hubo efecto de la Met ni de la proteína con 18 y 23% de PD. Medias en 28 y 33% de PD con diferentes literales minúsculas corresponden a los efectos de la metionina en cada variable analizada y son significativamente distintas ($P < 0.05$). Medias en 28 y 33% de PD con diferentes literales mayúsculas corresponden a los efectos principales de cada variable analizada y son significativamente distintas ($P < 0.05$). ²El análisis con Chi² no mostró respuesta por efecto ($P > 0.05$) de los tratamientos sobre la supervivencia.

En lo que respecta a la relación de la eficiencia proteica, se observó una tendencia similar a la del alimento consumido, es decir, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de 18 y 23% de PD (1.96 y 1.61, respectivamente) y éstos fueron inferiores a los de 28 y 33% de PD (1.51 y 1.32), siendo ambos grupos diferentes entre sí.

Los resultados del análisis de varianza anidado (Tabla XVIII) mostraron que hubo efecto significativo ($P < 0.0001$) de la concentración de metionina del alimento sobre los parámetros zootécnicos evaluados, en particular en los grupos de alimentos conteniendo 28 y 33% de PD, mientras que no hubo efecto ($P > 0.05$) en los grupos de alimentos con 18 y 23% de PD.

Dentro del grupo de organismos alimentados con los alimentos con 28% de PD, el mayor peso fue alcanzado con el alimento que contenía 1.05% de metionina, el cual fue diferente a todos los demás, seguido de los dos con 0.60 y 0.90% de metionina, que no fueron diferentes entre sí, y que fueron superiores a los alimentos con 0.45 y 0.75% de metionina.

Para el grupo de organismos alimentados con los alimentos con 33% de PD, los mayores pesos finales se obtuvieron con los niveles altos de metionina (0.85, 1.00 y 1.15 %), mientras que los más bajos se obtuvieron con 0.70 y 0.55% del aminoácido, existiendo diferencias significativas únicamente entre los niveles de 0.85 y 1.00 con respecto a los de 0.70 y 0.55% de metionina.

El consumo aparente de alimento en los alimentos con 28% de PD, fue menor con 0.75 y 0.45 % de metionina, siendo éstos similares entre sí, seguidos del de 0.60% de metionina,

con el cual el consumo fue mayor a los dos anteriores, pero similar al encontrado con los alimentos con 1.05 y 0.9% de metionina, que no fueron diferentes entre sí. El mayor consumo de alimento, se registró con el alimento que contenía 0.9% de metionina.

En el caso del grupo de alimentos con 33% de PD, el mayor consumo se obtuvo con el alimento que contenía 1.00% de metionina, el cual fue diferente al registrado con los otros niveles de metionina (0.55, 0.75, 0.85 y 1.15%), que no fueron diferentes entre sí.

En lo que se refiere a la conversión del alimento, con 28% de PD se detectó que los alimentos con 0.45, 0.60, 0.75 y 1.05% de metionina tuvieron conversiones significativamente más bajas que con 0.90% de metionina, mientras que la eficiencia proteica con éste último alimento fue significativamente menor a las registradas con todos los demás alimentos. Dentro del grupo de alimentos con 33% de PD, se encontró que la mejor conversión fue registrada con los alimentos que contenían 0.55, 0.70, 0.85 y 1.15% de metionina, sin diferencias entre sí, siendo la excepción la de 1.00% de metionina, la cual la fue más alta, y diferente a las anteriores. Por el contrario, la eficiencia proteica más baja se encontró con éste mismo alimento, siendo significativamente menor a las registradas con los demás alimentos.

En lo que respecta a los alimentos con 28 y 33% de PD, las regresiones indicaron que la respuesta lineal fue la que mejor se ajustó para los alimentos con el nivel de 28% de PD con significancia de $P < 0.001$ (Figura 1) y de $P < 0.034$ con los alimentos con 33% de PD (Figura 2).

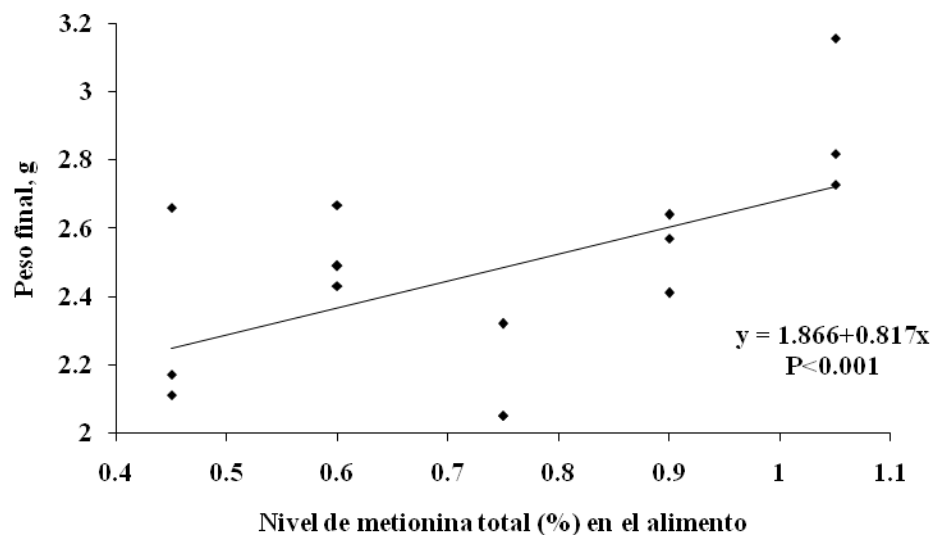


Figura 1. Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 28% de proteína digerible, sobre el peso final de juveniles de camarón.

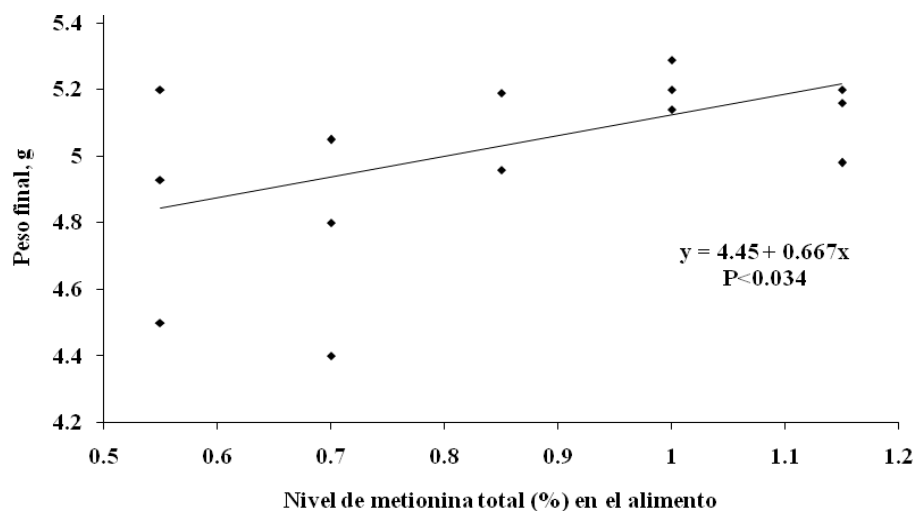


Figura 2. Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 33% de proteína digerible, sobre el peso final de juveniles de camarón.

En lo que se refiere al consumo aparente de alimento, no se encontró una tendencia significativa en el modelo de regresión en los alimentos con 18 y 23% de PD. En cambio, mientras mayor fue el contenido de metionina en el alimento, se observó un mayor consumo de los alimentos con 28% de PD ($P < 0.039$) (Figura 3).

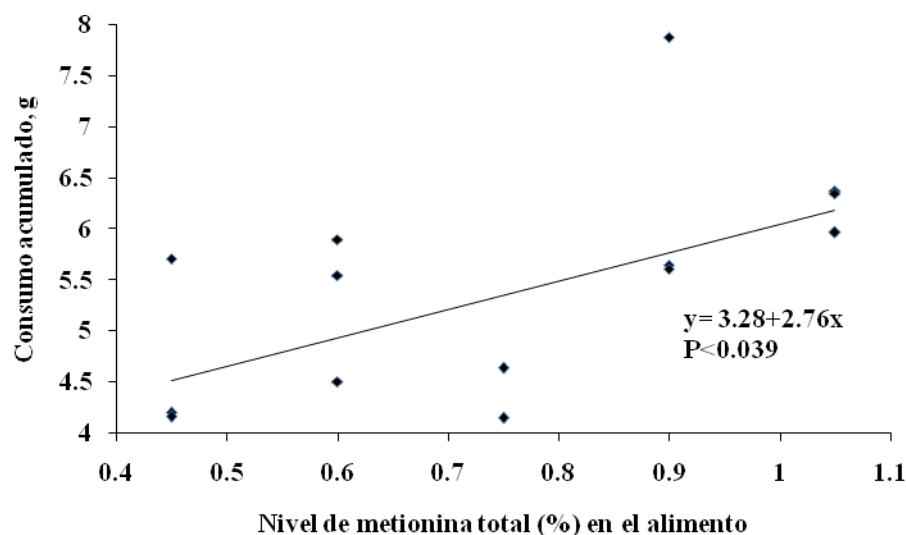


Figura 3. Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 28% de proteína digerible, sobre el consumo de alimento en juveniles de camarón

En el caso de los alimentos con 33% de PD, el modelo de regresión (Figura 4) para la variable consumo de alimento mostró un efecto cúbico significativo ($P < 0.027$). Con la ecuación cúbica generada por el análisis de regresión, y después de utilizar la técnica de la primera derivada, se obtuvo el punto de inflexión de la curva con un valor de 1.0% de metionina total en el alimento para camarón. Sin embargo, es importante aclarar que en este caso el valor obtenido como punto de inflexión no representa el nivel óptimo de metionina

en el alimento, ya que tan solo indica en qué nivel de metionina se generó el mayor consumo de alimento, y a partir del cual el consumo vuelve a descender (Figura 4).

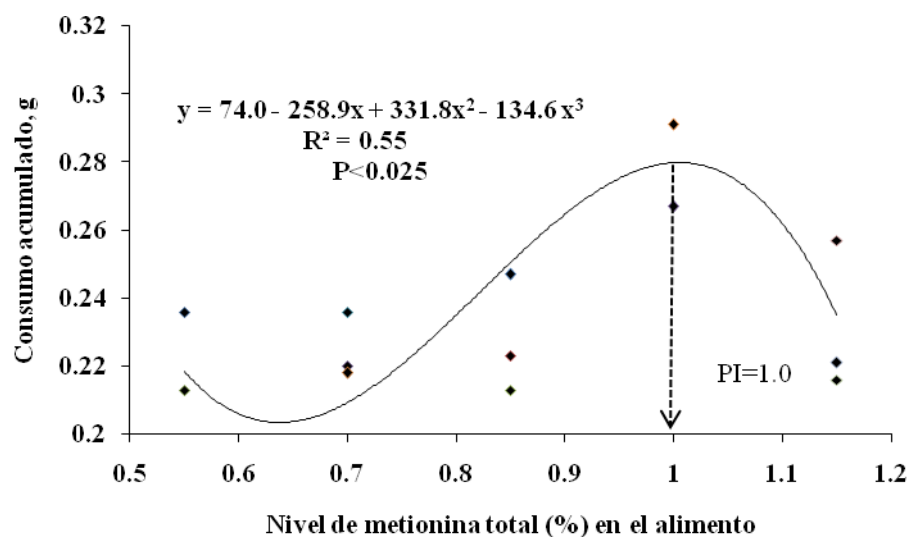


Figura 4. Efecto del nivel de metionina total, en alimentos con 33% de proteína digerible, sobre el consumo de alimento en juveniles de camarón. PI = punto de inflexión.

Por último, en lo referente a las variables de conversión alimenticia y de eficiencia proteica, no se encontró una correlación significativa en ninguno de los modelos de regresión probados (lineal, cúbica o cuadrática) en ninguno de los cuatro niveles de PD evaluados.

II.2.1. Proteína en el músculo de la cola

La concentración de proteína cruda en el músculo de la cola de los camarones alimentados con algunos de los alimentos evaluados en el bioensayo de crecimiento se muestra en la Figura 5. Para el caso de los dos niveles más bajos de proteína digerible, se tomaron como referencia los alimentos con 18 y 23% de PD, conteniendo 0.25 y 0.35% de metionina inicial (aportada por los ingredientes) respectivamente, sin la adición de DL-metionina, en virtud del pobre crecimiento que se obtuvo en estos dos grupos de alimentos.

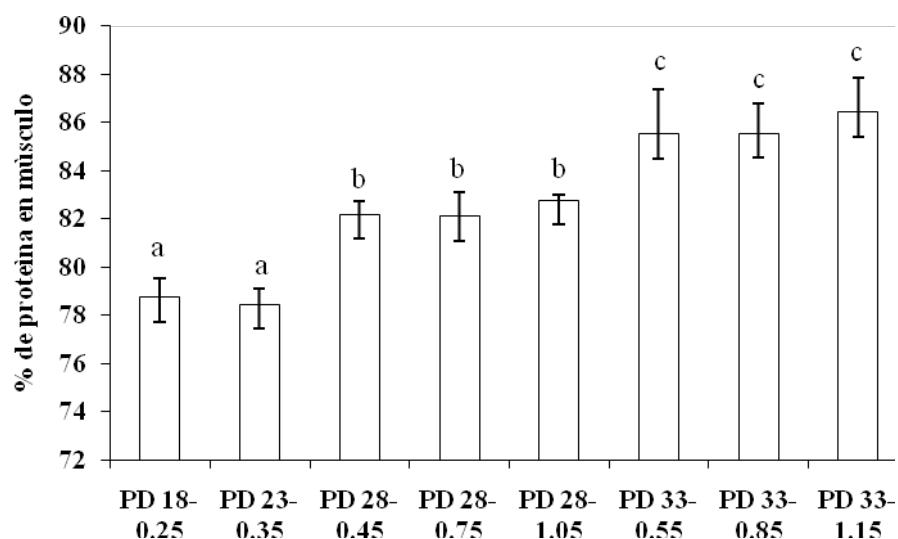


Figura 5. Contenido de proteína cruda (g/100 g de materia seca \pm D.E.) en el músculo de la cola de los camarones al final del bioensayo de crecimiento, después de haber sido alimentados durante 44 días con alimentos que contenían 18, 23, 28 y 33% de proteína digerible (PD) y diferentes niveles de metionina total (% en base húmeda). Barras con literales distintas representan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.

Los resultados indicaron que la cantidad de proteína encontrada en el músculo de la cola fluctuó entre 78.5% y 86.4% con una diferencia de 8 puntos porcentuales entre el más bajo (23% de PD, DL-Met 0.35%) y el más alto (33% de PD, DL-Met 1.15%).

Después de 44 días de bioensayo, los camarones alimentados con los alimentos con 18, 23, 28 y 33% de PD fueron diferentes ($P < 0.05$) entre sí, independientemente del nivel de DL-metionina adicionado. En ningún caso se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de PC en el músculo de la cola entre tratamientos dentro cada nivel de proteína digerible evaluado.

DISCUSIÓN

1. Digestibilidad aparente de ingredientes de origen marino y terrestre

1.1 Composición química y digestibilidad de materia seca y proteína de ingredientes de origen marino

La disponibilidad biológica de proteína y aminoácidos es un elemento importante a considerar, ya que está relacionada con la cantidad de nitrógeno retenida por el camarón. En condiciones de cultivo con alta densidad, alrededor del 78% del nitrógeno contenido en la proteína del alimento es eliminado al medio ambiente (Jackson *et al.*, 2003). Los alimentos de baja digestibilidad incrementan la acumulación de compuestos nitrogenados en el agua y el suelo, lo cual favorece condiciones de estrés para el camarón, que repercuten eventualmente en una mayor incidencia de enfermedades y mortalidad (Lin *et al.*, 2006). Las cuatro harinas de pescado evaluadas en el presente trabajo no variaron mucho entre ellas en cuanto a su composición proximal, excepto la HPD, la cual tuvo un menor contenido de proteína (60.5%) y la HPC con una menor cantidad de lípidos (2.8%).

La composición proximal de las 4 harinas estudiadas fue similar a la reportada para otros tipos de harinas de pescado (Anderson *et al.*, 1997; NRC, 1993). La composición nutricional y calidad de las harinas de pescado puede variar sustancialmente en función del grado de frescura y tipo del material crudo que se emplea en su fabricación, además de las condiciones que se aplican durante su procesado y cocción (Smith *et al.*, 2000), particularmente, en lo que se refiere a la temperatura empleada durante su cocción y secado (Terrazas *et al.*, 2005).

La DAMS y la DAP de la HPA (sardina Monterrey, lote del año 2005, Planta Conservera San Carlos) obtenidas aquí fueron muy similares a las de la harina de anchoveta reportada por Cruz-Suárez *et al.* (1998). En el presente estudio, la HPB (sardina Monterrey, lote del año 2006, Productos de Ensenada, B.C.) y la HPD (harina de atún) tuvieron coeficientes de digestibilidad (DAMS y DAP) similares a los de una harina de arenque estudiada por Cruz-Suárez *et al.* (2000), mientras que la harina HPC (sardina Monterrey, lote del año 2006, Conservera San Carlos) tuvo DAMS y CUDAP más bajas que las encontradas en otras harinas de pescado reportadas en otros estudios (Cruz-Suárez *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000).

De acuerdo a lo recomendado por Cruz-Suárez *et al.* (1998), la harina de pescado usada como ingrediente para alimentos de camarón debe tener al menos 85% de proteína digerible y una cantidad de cenizas menor a 15%, por lo que esas harinas deben ser cocidas y secadas a bajas temperaturas. Éstas características fueron cubiertas por la HPA, la cual mostró la mejor DAP, siendo relativamente similar al promedio de ocho harinas de pescado reportadas por Lemus *et al.* (2009). Las diferencias encontradas en la DAP en las harinas de pescado A, B, C, y D pueden ser atribuidas a las distintas materias primas (sardina entera o subproductos de atún), al sitio (Ensenada, B.C. o San Carlos B.C.S.) y condiciones de procesamiento usadas en su fabricación, así como a factores desconocidos relacionados con cada lote que es producido (San Carlos 2005 ó 2006). Todos los elementos anteriores deben ser considerados en la selección de ingredientes para los alimentos para camarón.

En el caso del concentrado proteico de solubles de pescado (CPSP), menores cantidades de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), y energía bruta (EB), con la excepción de cenizas

(C), fueron reportadas por Arzel *et al.* (1999). A diferencia de lo anterior, una mayor cantidad de PC, EE, y EB han sido reportados por otros autores en el CPSP (Guillaume *et al.*, 2004). Hasta donde se sabe, no existen reportes en la literatura científica sobre valores de digestibilidad de materia seca y de proteína del CPSP en otras especies de crustáceos, que puedan ser utilizados para comparar los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo. No obstante, valores de DAMS (90%) y de DAP (95%) con el CPSP fueron reportados en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Cho *et al.*, 1985) siendo considerablemente menores a los encontrados en el presente estudio (102.1% y 99.3%, respectivamente), lo que sugiere que este ingrediente es mejor utilizado por el camarón.

La composición química de la harina de calamar (HCAL) usada en el presente estudio mostró un menor contenido de PC y EE que lo reportado por otros autores (Guillaume *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005) y un menor aporte de EB comparado con lo reportado por Arzel *et al.* (1999). La DAP de nuestra harina calamar (93.9 %) fue mucho mayor al valor de 79.9% encontrado por Akiyama *et al.* (1989) y a los porcentajes de 75-89% reportados por Córdova Murrieta y García Carreño (2002). Las diferencias comentadas anteriormente, pueden atribuirse a varios factores, tales como diferentes especies de calamar utilizadas, variaciones estacionales al momento de su captura y composición química, métodos de preparación de la harina, así como el método empleado para determinar los coeficientes de digestibilidad. En general, parece ser que la harina de calamar es una buena fuente de proteína altamente disponible para el camarón.

Lim *et al.* (1997) estudiaron la harina de cabeza de camarón como alimento para el camarón blanco, encontrando una concentración similar de PC (48.4%), con mayores

cantidades de EE (5.7%) y de cenizas (10%) que la harina de cabeza de camarón (HCAM) utilizada en el presente trabajo. Las concentraciones de PC y el EE en la HCAM fueron menores a los valores encontrados previamente (Villarreal *et al.*, 2006). También, nuestra HCAM presentó mayores cantidades de FC y cenizas que las mencionadas por los mismos autores.

Los coeficientes de DAP y DAMS (84% y 93%) de la HCAM del presente estudio resultaron más altos que los reportados por el grupo de Akiyama *et al.* (1989) (57 y 75% respectivamente). Los menores valores de digestibilidad encontrados por ellos probablemente estén relacionados a la mayor cantidad de cenizas (34.5%) y fibra cruda (10.5%) en su harina de camarón, ya que la digestibilidad del ingrediente se ve reducida conforme la cantidad de fibra y cenizas se incrementan (Yang *et al.*, 2009).

La harina de langostilla (HLAN) analizada tuvo valores iguales en su composición proximal y EB que los encontrados por Gutiérrez-Leyva (2002) y, Naegel y Rodríguez-Astudillo (2004). Un mayor coeficiente de digestibilidad de materia seca en la HLAN, (74.2%) fue reportado por Goytortúa-Bores *et al.* (2006), mientras que la digestibilidad de la proteína fue igual (84.0%), con respecto al presente estudio. En cambio, la DAMS y la DAP de la HLAN preparada en el laboratorio del CIBNOR fueron superiores a los encontrados en una harina de cangrejo (tipo no especificado) consumida por el camarón *Penaeus setiferus* (Brunson *et al.*, 1997) y por el camarón blanco *L. vannamei* (Ezquerro *et al.*, 1997).

Al igual que lo que ocurre en otras harinas de crustáceos, la HLAN contiene alrededor del 9% de quitina de su peso seco (Castro-González *et al.*, 1995), y la quitina contiene nitrógeno, por lo que al determinar en laboratorio la concentración de proteína usando el factor de conversión $N \times 6.25$, el contenido de proteína verdadera es sobreestimada, lo que en el caso de la harina de langostilla el error es cercano al 0.62% (Goytortúa-Bores *et al.*, 2006). Esa sobreestimación es la causa de diferencias en la DAP entre distintas harinas de crustáceos en los estudios de alimentación. A fin de evitar dicha sobreestimación para el cálculo de la DAP en las harinas de crustáceos evaluadas aquí (HLAN y HCAM), se utilizó la suma de las cantidades de aminoácidos esenciales y no esenciales analizados en laboratorio sobre las muestras de alimentos y de heces, y de esta manera los porcentajes de PC no tuvieron que ser corregidos por el contenido de nitrógeno en la quitina.

En lo que corresponde a la harina de desechos de la almeja Catarina (HDAC), ésta mostró una concentración considerablemente menor de PC y FC, así como valores más altos de EE que una harina de almeja (tipo no especificado) reportada por Sudaryono *et al.* (1995), que fue utilizada como fuente alterna de proteína para la alimentación del camarón tigre gigante *Penaeus monodon*. La HDAC preparada en el laboratorio del CIBNOR presentó una menor cantidad de PC y EB, con mayores porcentajes de EE y cenizas que los valores encontrados en una harina de mejillón, *Perna canaliculus* (Smith *et al.*, 2005b) (la FC no fue reportada). Estos resultados son congruentes, dado que la HDAC fue fabricada a partir de vísceras de almeja Catarina sin el músculo aductor, el cual fue removido previamente para consumo humano.

1.2 Digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes de origen marino

Los coeficientes DAAA de los nueve ingredientes marinos estudiados se muestran en la Tabla XI. Los valores de utilización digestiva aparente fluctuaron desde 61.4% para Lis en la HPB hasta 105.4% para el mismo aminoácido en la HCAM. Valores de digestibilidad mayores al 100% han sido reportados anteriormente, esto puede ser atribuido al nivel de inclusión (30%) de los ingredientes evaluados y a la cantidad (1.0%) de óxido crómico usada en el presente estudio (Divakaran *et al.*, 2000). Convencionalmente, es de suponer que los coeficientes de digestibilidad fluctúen entre 0 y 100%, pero hasta ahora no se ha determinado completamente el por qué en ocasiones se generan resultados con digestibilidades mayores al 100%. Sin embargo, valores negativos (Akiyama *et al.*, 1989) o mayores al 100% en la digestibilidad medida con camarones no son inusuales, ya que han sido reportados en otros estudios (Divakaran *et al.*, 2000; Cruz-Suárez *et al.*, 2001; Rivas-Vega *et al.*, 2009).

Cruz-Suárez *et al.* (2009) sugieren que la digestibilidad en algunos aminoácidos, como en el caso de la lisina y la metionina, pueden ser sobrestimados debido a su alta solubilidad en el agua marina. Coeficientes de digestibilidad inesperados se pueden obtener debido a posibles interacciones entre ingredientes (digestibilidad no aditiva) o al contenido de material endógeno en las heces, como puede ser la membrana peritrófica (Akiyama *et al.*, 1989), ya que ésta contiene ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, treonina, alanina, histidina y leucina (Cuzon *et al.*, 2004). Valores de 110% en la digestibilidad de la proteína en el gluten de trigo con el camarón *P. setiferus* fueron reportados por Brunson *et al.* (1997); ellos atribuyeron esa elevada digestibilidad a posibles interacciones entre los

nutrimentos de los ingredientes, puesto que en ese ingrediente se encontraron menores niveles de fibra cruda y cenizas. Otra razón que puede afectar la correcta determinación de la digestibilidad, puede estar relacionada con las elevadas temperaturas que en ocasiones son utilizadas durante la fabricación de algunos ingredientes, ya que se ha demostrado que se origina un daño en la estructura de los aminoácidos, afectando su digestibilidad (reacción de Maillard). Dependiendo de la intensidad de la reacción, algunos aminoácidos pueden ser absorbidos y luego eliminados en la orina sin ser metabolizados por lo cual no están disponibles para la síntesis de proteína (Sibbald, 1987; Fernández, 1996; Miller, 2002; Terrazas *et al.*, 2005).

Por lo anterior, los aminoácidos que han sido alterados por altas temperaturas pueden contribuir a sobreestimar los valores de digestibilidad si no son analizados en muestras de orina. Aunque el experimento realizado por Liou *et al.* (2005) no se relaciona con lo comentado en el párrafo anterior, ellos desarrollaron una técnica para la colecta de orina en camarones para determinar el contenido de aminoácidos, sin embargo, es un método poco práctico.

La concentración de aminoácidos presentes en las harinas de pescado comerciales fue relativamente consistente y acorde con los datos reportados en la literatura (NRC, 1994 y 1998; AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA, 2006).

La DAAA de las 4 harinas de pescado mostraron valores mixtos en relación con los encontrados en la literatura publicada, ya que la harina HPA presentó valores de digestibilidad mayores en sus aminoácidos que los encontrados en las harinas HPB, HPC y

HPD, y estas últimas tuvieron menor biodisponibilidad en los aminoácidos que los encontrados en una harina de pescado (arenque) evaluada con camarón blanco (Akiyama *et al.*, 1989), que tenía una gran cantidad de cenizas (21.3%), mayor que la contenida en las harinas que se evaluaron en el presente trabajo (en promedio 12% de cenizas). Se sabe que generalmente, un contenido alto de cenizas en el alimento resulta en una menor digestibilidad (Parsons, 1991).

De acuerdo con lo anterior, en este estudio se encontraron digestibilidades bajas de los aminoácidos en los alimentos con las harinas FMB, HPC y HPD a pesar de que tuvieron un contenido de cenizas cercano al 12% muy similar entre ellas; por lo que posiblemente esas diferencias tengan que ver más con un problema que se da en el uso de las harinas de pescado, y éste es que, se corre el riesgo de que éstas sean fabricadas con material crudo con distinto grado de frescura, y luego sean sometidas a distintas condiciones de cocción y secado, lo que puede modificar el grado de digestibilidad de las mismas (Terrazas *et al.*, 2005). A pesar de que se tiene información de los proveedores de las harinas, hubiera sido conveniente conocer la época de captura de la materia prima, condiciones de refrigeración, el tiempo de exposición a la temperatura y la intensidad misma durante su fabricación.

La digestibilidad de la cistina fue la más baja. Se conoce que este aminoácido es muy sensible al calor, al igual que el grupo épsilon de la lisina, ya que estos aminoácidos son alterados por la reacción de Maillard en donde se unen aminoácidos con azúcares reductores del alimento (Terrazas *et al.*, 2005). La cistina ligada a proteínas tiene una baja digestibilidad (Miller *et al.*, 2001) dado que durante la exposición al calor se origina un

reacomodo de los puentes disulfuro, generando enlaces entre dos moléculas de azufre (Miller, 2002) y esa estructura es hidrolizada con menos eficiencia por las enzimas proteolíticas del tracto digestivo (Baker, 2005).

De acuerdo con los proveedores, las cuatro harinas fueron procesadas con cocción y secado con vapor indirecto, sin especificar a qué temperaturas, pero es posible que la diferencia entre la HPA y las tres restantes, esté relacionada también con el grado de frescura, el pescado usado como materia prima y su composición química.

La concentración de aminoácidos obtenida en la harina de almeja Catarina fue mayor a la reportada por Abe y Miyashita (2007) en el músculo aductor crudo de almeja (*Patinopecten yessoensis*), excepto para Met y Arg. Los valores reportados (Smith *et al.*, 2005) en el contenido de Arg, Met, Cis, Lis, Tre y Tir en la carne de mejillón fueron superiores a los generados por los análisis de la HDAC en este experimento. Sudaryono *et al.* (1995) reportaron 92% de DAP en una harina de desperdicios de almeja, que fue mayor que los promedios de DAP (86.9%) y DAAA (de diez aminoácidos valorados: 87.9%) en la HDAC de nuestro estudio. Hasta donde sabemos, no existen reportes previos en la literatura sobre la digestibilidad de materia seca y de proteína de la harina de desperdicios de almeja Catarina, pero los resultados obtenidos aquí hacen suponer que la HDAC es una fuente adecuada de proteína y aminoácidos para el camarón blanco.

En lo que corresponde al CPSP, el contenido de PC y aminoácidos fue menor que los montos reportados en otro estudio por Arzel *et al.* (1999), excepto en lo que se refiere a Arg

y Leu. En la evaluación de una harina de solubles de pescado en peces (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*), Gaylord *et al.* (2004) encontraron resultados variables en la digestibilidad de aminoácidos como Arg y Leu (80%), Met y Tre (74 y 66%), Ile y Val (51 y 53%), His (60%) y Lis (31%). Los valores antes mencionados fueron muy bajos con respecto a los obtenidos en el CPSP estudiado aquí. Los valores elevados en los coeficientes de DAAA del CPSP responden a su contenido de proteínas solubles de pescado que regularmente contienen altas cantidades de aminoácidos libres, lo que facilita su absorción en el tracto digestivo.

Es factible que exista una sobreestimación de la digestibilidad por lixiviación de los nutrimentos en las heces, como ya ha sido reportado por Cruz-Suárez *et al.* (2009). Sin embargo, la membrana peritrófica sólo permite el paso de material inerte siempre y cuando no sea mayor a 20 nm (Martin *et al.*, 2006). A pesar de la que lixiviación de aminoácidos no fue cuantificada en el presente estudio, se realizó una colecta frecuente de heces con rondas continuas para su recuperación y minimizar esa posibilidad. En relación con lo anterior, el alimento al que se incorporó el CPSP fue el que presentó la más baja hidroestabilidad de la materia seca de todos los ingredientes (89.6%), y la digestibilidad de la materia seca (102%) y de la proteína (99.3%) fueron las más altas, lo que posiblemente sea parcialmente consecuencia de su mayor lixiviación.

En el caso de la HLAN, Carrillo-Domínguez (1993) reportó cantidades similares de Cis, Lis, Val y His, con mayores niveles de Met, Tre, Leu e Ile, y menores en Arg que los encontrados en la harina de este estudio. Por otra parte, en virtud de que no se cuenta con

información que permita hacer una comparación de la digestibilidad de aminoácidos en harina de langostilla en camarones u otros crustáceos, se utilizó el trabajo publicado por Castro (1993), quien empleó gallos adultos Leghorn blancos para determinar la digestibilidad de seis aminoácidos de la harina de langostilla, reportando menores coeficientes para Met, Tre, Arg y Cis, y en cambio, otros similares (Lis y Val) a los obtenidos aquí con *L. vannamei*.

Las comparaciones antes mencionadas deberán tomarse con reserva, debido a las diferencias que existen entre el tracto digestivo del camarón y el gallo doméstico (Cuca *et al.*, 1990), y por las distintas condiciones bajo las cuales se manejan a esos dos organismos (agua y tierra); de igual manera se debe considerar que Castro-González (1995) utilizó la técnica de alimentación precisa, en donde se ofrece al organismo únicamente el ingrediente a evaluar (NRC, 1994), a diferencia del nivel de incorporación (30%) usado aquí para cada ingrediente evaluado en el bioensayo de digestibilidad.

La HLAN estudiada mostró una concentración elevada de cenizas (39%) al ser comparada con los otros ocho ingredientes evaluados en este experimento, y ésta presentó una baja utilización digestiva de los aminoácidos. Como ya se ha sugerido, ese puede ser un efecto del alto contenido de cenizas de acuerdo a lo reportado por Yang *et al.* (2009), no obstante, el factor temperatura explica mejor la intensidad de la digestibilidad de la proteína, ya que Siccardi *et al.* (2006) no encontraron que hubiera una correlación entre el contenido minerales en distintos ingredientes con el grado de digestibilidad de la proteína.

Así mismo, una característica de la harina de crustáceos es su contenido de quitina; ésta estructura es un componente del exoesqueleto y se ha encontrado que es de muy baja digestibilidad (3%) para el camarón blanco, lo cual fue reportado por Akiyama *et al.* (1989) incorporando 88% de quitina a un alimento de referencia. La composición de la HLAN puede variar en respuesta a varios factores relacionados con la estación, lugar y profundidad de captura entre otros (Castro-González, 1995), los cuales pueden modificar su digestibilidad.

Es recomendable tener cuidado al descartar el uso de ingredientes de relativa baja digestibilidad, ya que en ocasiones pueden tener efectos benéficos, como fue demostrado por Goytortúa-Bores *et al.* (2006), quienes encontraron un incremento significativo en la digestibilidad de la proteína de alimentos para camarón a los que se les incorporó harina de langostilla con respecto a un alimento control. Dicha harina fue utilizada en sustitución parcial de una harina elaborada con desperdicios de atún y se observaron adicionalmente mejoras en el crecimiento, conversión alimenticia y eficiencia proteica en juveniles del camarón blanco.

La harina de cabeza de camarón (HCAM) estudiada aquí, presentó un perfil de aminoácidos similar al reportado por AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA (2006), y menor al encontrado por Fox *et al.*, 1994 (ellos no reportaron Cis). También es congruente con las cantidades mencionadas por Coward-Kelly *et al.* (2006) ya que la harina de cabeza de camarón analizada por ellos mostró que es rica en Leu, Arg, Val y Lis, aunque deficiente en Met e His, lo cual es igual a lo encontrado en este estudio; tampoco se incluyó a Cis en sus

análisis. Por otra parte, en un reporte previo (Akiyama *et al.*, 1989) con la HCAM se obtuvo una menor digestibilidad aparente en los aminoácidos que los obtenidos aquí. Esto podría ser resultado de diferencias en la metodología usada por Akiyama *et al.* (1989) en la cual se incluyó un 88% de cada ingrediente al alimento de referencia a evaluar en un alimento de referencia; además de posibles efectos de la composición química de los ingredientes y al proceso usado durante su manufactura (Smith *et al.*, 2000; Terrazas *et al.*, 2005). Tanto la PC y aminoácidos, como su digestibilidad, fueron mejores en la HCAM DAMS (84%), DAP (98.0%) y DAAA (93.3-105.4%) que en la HLAN, DAMS (51.6%), DAP (84.6%) y DAAA (61.2-97%), lo que puede ser atribuido a la menor concentración de cenizas en HCAM que en HLAN, siendo un ingrediente recomendable para el camarón blanco.

Los valores del perfil de aminoácidos analizados en la HCAL fueron más altos que los encontrados en otros reportes previos (Arzel *et al.*, 1999; Guillaume, 2004), excepto para Cis, His y Tre los cuales fueron menores. Los resultados obtenidos en este experimento sobre los aminoácidos encontrados en la HCAL son congruentes con los valores analizados por AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA, 2006. La harina de calamar evaluada anteriormente (Akiyama *et al.*, 1989) tuvo una menor digestibilidad de aminoácidos (73.6~79.4%) que la obtenida aquí (85.8~99.5%), lo cual podría ser resultado de los mismos factores que se mencionaron en el párrafo anterior para la HCAM. La harina de calamar (*Loligo gahi*) usada en este estudio, es una buena fuente de aminoácidos con una digestibilidad en ellos superior al 85.8% para el camarón blanco.

1.3 Composición química y digestibilidad de materia seca y proteína de ingredientes de origen terrestre

La caseína empleada aquí presentó una cantidad similar de proteína, mayor contenido de fibra, pero menor de lípidos y de cenizas que la caseína reportada por Mu *et al.* (2000). Esto puede deberse al origen y al proceso de elaboración del ingrediente, sin embargo, el contenido de aminoácidos encontrado en la CASE fue similar al perfil reportado previamente (AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA, 2006). La caseína es un ingrediente semipurificado, al cual se le han eliminado las vitaminas durante el proceso de elaboración, y es comúnmente utilizado como fuente de proteína para estudios nutricionales ya que tiene un elevado contenido de proteína y aminoácidos altamente digeribles (Tacon, 1989) aunque no se utiliza para la fabricación de alimentos para acuicultura debido a su elevado costo y a que es deficiente en arginina y lisina para los organismos acuáticos.

Las cantidades de PC y EE en la harina de subproductos de ave del presente estudio, fue similar y menor, respectivamente, a los valores reportados por Thompson *et al.* (2008), mientras que los contenidos de FC y de cenizas fueron menores a los valores encontrados por Cheng *et al.* (2002). En el caso de la energía, esta fue similar a la reportada por estos últimos autores. Asimismo, Cheng *et al.* (2002) reportaron en una HSPA, una mayor cantidad de Met, Lis, Ile e His, una cantidad similar de Arg, Fen, Val, y menores valores de Leu, Tre y Val que en la harina evaluada aquí.

Hernández *et al.* (2008) reportaron la composición proximal de la HSPP y es similar a la analizada aquí. El perfil de aminoácidos de la HSPP analizada aquí, expresado como porcentaje de la proteína, fue muy cercano al perfil reportado por Hernández *et al.* (2008),

con resultados mixtos ya que por ejemplo la metionina y la treonina fueron más altas en la harina mencionada por el mismo autor, y la valina y la treonina más altas en la harina estudiada aquí, siendo similares las concentraciones de arginina en ambas. La harina reportada por ellos y la evaluada aquí, posiblemente tuvieron como origen a distinta materia prima y distintas condiciones empleadas en su fabricación, ya que fueron adquiridas de distintos proveedores, lo cual pudo influir en su composición química; la harina evaluada aquí fue tamizada a 500 micras, en el caso de la usada por Hernández *et al.* (2008) no se especificó a qué tamaño fue tamizada.

La harina de trigo experimental mostró una cantidad de proteína similar, con menores cantidades de EE y cenizas que los valores encontrados en el estudio realizado por Gatlin III *et al.* (2007). Los resultados obtenidos en proteína cruda y contenido de aminoácidos en los productos de trigo (harina y gluten) de nuestro estudio fueron similares a los encontrados en otras Tablas de composición química de ingredientes (AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA, 2006).

La composición proximal de la HSOR tuvo cantidades similares de PC y EE que las reportadas por el NRC (1998). El contenido de cenizas fue muy parecido a los valores encontrados en cuatro variedades de sorgo por Mariscal-Landín *et al.* (2004). La harina de sorgo estudiada aquí, tuvo un 10% menos de energía que la encontrada por Rawles y Gatlin III (2000). El grano de sorgo fue finamente molido y tamizado, lo cual reduce el contenido de fibra cruda e incrementa la proteína. No obstante, la harina tuvo cantidades muy bajas de

proteína y aminoácidos con respecto a los análisis reportados en otros sorgos (Dale, 1995, NRC, 1998).

La pasta de soya analizada presentó contenidos similares de PC, cenizas y EB, con mayor cantidad de EE y una menor de FC, que las cantidades reportadas por Fagbenro y Davies (2001) para ese mismo ingrediente. La cantidad de aminoácidos en la PSOY fue más alta que lo reportado por Sudaryono *et al.* (1999), lo cual es consistente con el mayor contenido de proteína cruda y el menor de fibra cruda en la PSOY estudiada aquí.

El gluten de maíz tuvo un contenido mayor de PC que el encontrado por otros autores (Tibbetts *et al.* 2004, Kaur y Saxena, 2005) mientras que su contenido de EE, FC y energía fueron menores. Por el contrario, la cantidad de FC en el GLM reportada por Kaur y Saxena (2005) fue muy alta con respecto a lo encontrado aquí. El GLM mostró un contenido mayor de aminoácidos, consistente con su mayor contenido de proteína cruda, al ser comparado con lo publicado previamente (NRC, 1994). Esto se debe a que los ingredientes evaluados fueron tamizados a 250 μm antes del bioensayo de digestibilidad y con ello se redujo el contenido de fibra cruda, resultando en una mayor concentración de proteína.

La composición proximal del gluten de trigo estudiado aquí tuvo un mayor nivel de proteína y EE, con menores cantidades de FC y cenizas, que el mismo ingrediente evaluado por Lazo *et al.* (1998), se aprecia de manera general, que la concentración de proteína en los ingredientes fue superior a la reportada por el mismo autor.

El perfil de aminoácidos de la proteína de la CASE fue muy similar al perfil encontrado en (AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA, 2006). Por su parte, Cheng *et al.* (2002) reportaron mayores cantidades de Met, Lis, Ile y His en una harina de subproductos avícolas comercial con una concentración similar de Arg, Fen, Val y menores de Leu, Tre y Val, que la HSPA evaluada aquí. Las diferencias entre la HSPA usada aquí y reportada por Cheng *et al.* (2002), posiblemente se deban a que fueron fabricadas a partir de material de origen, ya que la harina que se evaluó aquí fue elaborada a partir de subproductos de pollos y pavos, y bajo condiciones de cocción tal vez distintas en lo que se refiere a la temperatura usada, tiempo de exposición a la misma y calor directo o indirecto, ya que ambas provienen de diferente proveedor.

El perfil de aminoácidos de la HSPP comercial analizada aquí, expresado como porcentaje de la proteína, fue ligeramente mayor que el perfil de la harina de subproductos porcícolas reportada por Hernández *et al.* (2008).

El contenido de aminoácidos determinado en la PSOY evaluada en este experimento fue más alto que el mencionado en otro trabajo (Sudaryono *et al.* (1999); ese perfil está en concordancia con el nivel de proteína y fibra presentes en la pasta, los cuales tienen una relación inversa para el ingrediente (a mayor cantidad de fibra menor concentración de proteína).

El grano de sorgo fue finamente molido y tamizado en una malla de 250 μm , sin embargo, a pesar de que este proceso reduce la cantidad de FC y consecuentemente incrementa la

concentración de PC, la HSOR presentó un menor nivel de proteína y aminoácidos que otros granos citados en la literatura (Dale, 1995; NRC, 1998), el contenido de proteína cruda en el grano de sorgo puede variar hasta en un 30% dependiendo del nivel de fertilización (Lubis y Kumagai, 2007). Los resultados para PC y perfil de aminoácidos observados en los productos de trigo (grano y gluten) en este estudio fueron similares a los reportados en la literatura (AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA, 2006).

El GLM estudiado aquí mostró cantidades similares de aminoácidos, acorde con el nivel de PC encontrada en ese ingrediente, según lo publicado por el NRC (1994) y AminoDat 3.0 Gold, DEGUSSA, EUA (2006).

La digestibilidad aparente de materia seca de los ingredientes evaluados presentó diferencias significativas ($P < 0.05$), obteniéndose valores superiores al 80% en casi todos ellos con excepción de la harina de subproductos porcícolas, que fue inferior a 69%. El ingrediente que mostró mejor digestibilidad fue el gluten de trigo, seguido de la caseína.

Considerando que la DAMS puede ser útil para estimar la cantidad de material no digerible de un ingrediente o alimento, los ingredientes que mejor fueron aprovechados por el camarón fueron el gluten de trigo y la caseína.

En lo que se refiere a la caseína, ésta mostró los valores más elevados en los coeficientes de digestibilidad tanto de DAMS (97.3%) como de DAP (99.9%), similares a los reportados previamente por Akiyama *et al.* (1989).

Los valores de DAMS obtenidos con la HSPA son superiores a los reportados por Yang *et al.* (2009), mientras que Cruz-Suárez *et al.* (2009) reportaron valores similares a los encontrados en la HSPA estudiada aquí.

Para el caso de la HSPP, existe información que indica que la DAMS en un alimento para juveniles de camarón blanco al que se incorporó 25% de HSSP fue de 81%, mientras que la DAP fue de 85% (Hernández *et al.* 2008); esos valores fueron más altos que los encontrados en el presente estudio. También, la digestibilidad de la proteína en la HSPP medida *in vitro* que fue reportada por Hernández *et al.* (2008) fue menor (66.2%) al porcentaje que se obtuvo en este experimento (75.8%).

Lo anterior expuesto concuerda con el hecho de que la DAMS es afectada por altos contenidos de cenizas y fibra cruda (Sudaryono *et al.* 1995) por lo que es razonable pensar que la HSPP presente una DAMS tan baja (68.2%) con respecto a las demás, ya que es el ingrediente que presenta mayor cantidad de cenizas, lo cual era de esperarse dado que contiene carne y huesos de cerdo. Asimismo, es posible que el tamaño de partícula de la harina de subproductos de porcinos (500 μ m) haya disminuido su digestibilidad (el resto de los ingredientes se tamizaron a 250 μ m), ya que se ha reportado que a mayor tamaño de partícula la digestibilidad de un ingrediente generalmente es menor (Tacon, 1989). Al observar los valores obtenidos aquí, se puede suponer que el efecto de la fibra cruda y las cenizas sobre la DAMS está en función de su cantidad en el ingrediente, ya que la HSPA presenta una DAMS similar (89.0%) o superior a la de otros ingredientes con contenidos de cenizas y fibra cruda inferiores. Akiyama *et al.* (1993) recomiendan valores máximos de

cenizas y fibra de 15 y 4% respectivamente en los alimentos para camarón, ya que un exceso de estos compuestos tiende a disminuir la digestibilidad.

La HTRI usada en el bioensayo de digestibilidad mostró mayores coeficientes de DAMS y DAP que la digestibilidad obtenida en otros experimentos con *Penaeus setiferus* L. (Brunson *et al.*, 1997). En otro informe, Brunson *et al.* (1997) reportan valores de DAMS para la HTRI y la HSOR inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, lo cual es consistente con lo mencionado por Brunson y Romaine (1994) quienes encontraron valores menores de DAMS (44%) y de DAP (71%) en harina de sorgo en un trabajo experimental realizado con el camarón *Litopenaeus setiferus*.

Al comparar las dos harinas de cereales, la HSOR presentó menores coeficientes de digestibilidad (DAMS y DAP) que los encontrados en la HTRI. Ello podría deberse en parte a que el sorgo resultó con 6 veces más fibra y 4 veces más cenizas que las contenidas en la harina de trigo, y ambos factores han sido relacionados con una menor digestibilidad (Yang *et al.*, 2009) y por el hecho de que, los ingredientes fibrosos tienen una tasa de pasaje mayor por el trato digestivo del camarón siendo expuestos por menos tiempo a las enzimas digestivas (Lazo *et al.*, 1998). Asimismo, la estructura del almidón del sorgo presenta una mayor concentración de amilosa que de amilopectina que las encontradas en el grano de trigo (McKevith, 2004). En un experimento se explica que la amilosa de mayor densidad lo que dificulta su gelatinización (sin ser determinada) y por ende resultando en una menor digestión tanto de carbohidratos, como de la proteína (Cruz-Suárez *et al.*, 1994).

Por otra parte, algunas variedades de sorgo son altas en taninos, los cuales interfieren con la actividad enzimática al precipitar la fracción proteica de las mismas, decreciendo la digestibilidad del propio cereal o de otros ingredientes en un mismo alimento. Sin embargo, lo anterior no explicaría nuestros resultados en virtud de que el sorgo utilizado en este trabajo poseía una testa sin pigmentos, lo que supone la ausencia o baja cantidad de taninos (McKevith, 2004).

En lo que respecta a la pasta de soya, Akiyama (1991), Brunson *et al.* (1997) y Smith *et al.* (2000) determinaron coeficientes más bajos de DAMS y DAP que en la PSOY reportada en este experimento (85.4 y 100%, respectivamente). En otro experimento, se probaron diferentes niveles de PSOY y óxido de cromo en alimentos para camarón blanco, donde Divakaran *et al.* (2000) encontraron que la DAP de la PSOY fluctuó entre 91% y 102%. Por su parte, Cruz-Suárez *et al.* (2009) reportaron valores de digestibilidad similares a los generados aquí. Cabe mencionar que dichos autores trabajaron con distintos productos de soya, y no encontraron niveles de inhibidores de tripsina en niveles que pudieran interferir en la digestibilidad de la pasta, por lo que es razonable suponer que la soya evaluada aquí era de muy buena calidad.

El coeficiente de digestibilidad obtenido en este experimento con el gluten de maíz fue superior para la DAMS e inferior para la DAP con respecto a lo reportado por Yang *et al.* (2009).

Los valores de DAMS obtenidos con el gluten de trigo son superiores a los reportados por Yang *et al.* (2009), pero similares a los reportados por Brunson *et al.* (1997). Los valores de digestibilidad encontrados para materia seca y proteína del gluten de trigo fueron superiores al 100%. Altos coeficientes de digestibilidad han sido explicados parcialmente por problemas de lixiviación de nutrimentos en los alimentos (Cruz-Suárez *et al.* 2009), sin embargo, esta posibilidad es remota ya que el alimento de prueba con 30% de GLT presentó la mayor estabilidad (98.9%) en el agua (Tabla XIII). Otra explicación es la posible lixiviación de las heces del camarón, previa a su colecta, la que no puede ser determinada ante la imposibilidad de obtener muestras sin haber sido sometidas a inmersión (Brunson *et al.*, 1997).

La proteína es el ingrediente más crítico en los alimentos para camarón, tanto desde el punto de vista de costo, como de la respuesta de crecimiento del organismo. Además, juega un papel muy importante desde el punto de vista ecológico, ya que la proteína proveniente del alimento es una de las principales fuentes de nitrógeno en los estanques de cultivo, provocando eutroficación. Para el caso de la digestibilidad aparente de proteínas, el GLT, y la HTRI, la PSOY y la CASE presentaron valores significativamente superiores ($P < 0.05$) a los demás ingredientes, siendo el grano de sorgo el que presentó un valor significativamente inferior al resto de los ingredientes.

Akiyama *et al.* (1989) reportaron que la DAP de ingredientes semi-purificados o concentrados, es superior a la de los no purificados, lo cual se pudo observar en el presente trabajo al comparar los valores obtenidos entre el gluten y el grano de trigo (103.1% y

100.3% respectivamente). Los valores bajos de DAP obtenidos con la HSPP y en la HSOR (75.8 y 69.9% respectivamente) pueden estar relacionados, para el caso de la HSPP, a su alto contenido en cenizas y tamaño de partícula

En relación a la DAMS y la DAP del GLT y del GLM, la mejor digestibilidad encontrada en el GLT posiblemente no sea explicada por la cantidad de fibra cruda (0.44%) y cenizas (1.49%) en el GLM, ya que ambas son el doble de lo encontrado en el GLT (siendo esos valores relativamente bajos) por lo que es poco probable suponer que se pueda aplicar el fenómeno de que a mayor cantidad de ambas fracciones se obtiene una menor digestibilidad (Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, la diferencia en la digestibilidad entre los nutrimentos evaluados en el GLT y GLM posiblemente sea mejor explicada por la cantidad del extracto libre de nitrógeno, ya que esa fracción es 39% mayor en el GLM, y en ella se encuentra almidón, el cual posee una relación de amilosa con respecto a la amilopectina similar a la del grano de sorgo, siendo la estructura de la amilosa (un polímero lineal) un grupo de regiones con arreglos cristalinos los cuales son menos susceptibles a la hidratación durante el proceso de gelatinización posiblemente afecte negativamente a la digestibilidad (Cruz-Suárez *et al.*, 1994). De manera similar a lo reportado por Akiyama *et al.* (1989), en el presente trabajo los valores de DAP no forzosamente fueron influenciados por el origen del ingrediente, esto es, animal o vegetal.

1.4 Digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes de origen terrestre

Los valores de digestibilidad aparente de aminoácidos esenciales presentaron un comportamiento similar al de la DAP, donde los valores más altos se presentaron con el

GLT, la CAS, la PS y la HTRI, mientras que los valores más bajos se obtuvieron con la HSPP y en la HSOR. Esto resulta lógico, ya que la calidad o disponibilidad de la proteína presente en un ingrediente está en función de su contenido y disponibilidad de aminoácidos. La DAAA de la CASE que se obtuvo en este estudio presentó un patrón similar al encontrado por Akiyama *et al.* (1989).

Yu (2006) estudió la DAAA de la HSPA en dos especies de camarón (*P. monodon* y *L. vannamei*), y en términos generales, la digestibilidad para Arg, Val y Cis fue similar a la obtenida en el presente trabajo. El mismo autor reportó coeficientes mayores para His, Ile, Fen y Tre, e iguales para Met, Leu y Lis con respecto a lo obtenido aquí. La DAAA de todos los aminoácidos encontrados para la HSPP fueron menores, entre 10 y 20%, con respecto a lo reportado por Yu *et al.* (2006a).

En lo que corresponde a la DAAA del grano de sorgo usado en este estudio, no se encontró una referencia en la literatura que indique resultados de digestibilidad de aminoácidos en grano de sorgo con crustáceos; por ello y con las consideraciones de reserva los resultados obtenidos aquí indicaron una similitud en Met, Ile y Leu, con valores más altos para His, Lis, Fen, Tre y Val, y menores en Arg, que los reportados en la tilapia del Nilo según Guimarães *et al.* (2008).

En un trabajo donde se evaluaron distintos lotes de pasta de soya (Akiyama *et al.*, 1989) se obtuvieron coeficientes de DAAA menores en 9 aminoácidos (excepto Lis, el cual fue similar, y Fen que fue mayor) con respecto a los valores obtenidos en el presente estudio.

En lo que respecta al GLM, su inclusión a un nivel de 25% en alimentos para *L. vannamei* (Molina, 2004) mostró que la DAAA fluctuó entre 70.7% para la Fen y 96.7% para la Arg. Los coeficientes de DAAA en el GLT evaluado aquí fueron similares a los reportados por Akiyama *et al.* (1989).

La información generada en este trabajo permitirá desarrollar procesos de formulación de alimentos balanceados para el camarón blanco *L. vannamei* con ingredientes más amigables con el medio ambiente y aportar datos necesarios para el desarrollo de trabajos de investigación, a fin de determinar los requerimientos nutricios del camarón blanco con base en proteína y aminoácidos digeribles.

2. Efecto del nivel de proteína digerible y metionina en el alimento sobre el crecimiento del camarón

2.1 Efecto del nivel de proteína digerible

Los valores de proteína digerible (PD) de los alimentos no concuerdan con la cantidad de proteína cruda analizada en laboratorio, lo cual es de esperarse, y se debe básicamente a dos razones: la primera, por el hecho de que los reportes de la composición química se expresan convencionalmente en base seca (AOAC, 2005), mientras que los niveles de proteína digerible (18, 23, 28 y 33%) de los alimentos (Tabla XVII) están expresados en base húmeda, y la segunda, en virtud de que la proteína digerible generalmente es menor a la cantidad de proteína cruda analizada (Fernández, 1996). Los alimentos con 18, 23, 28 y 33% de PD, una vez analizados, mostraron una concentración promedio de proteína cruda en base seca de 19.9, 25.5, 31.4 y 36.9%, en el mismo orden de los alimentos, y una humedad promedio de 10.4, 9.9, 9.3 y 9.7%, respectivamente; al usar esos valores, la concentración de proteína cruda calculada en base húmeda sería de 17.8, 24.0, 28.5 y 33.3%, por lo que las concentraciones de proteína digestible calculadas serían de 17.8, 24.0, 27.3 y 32.8%.

El nivel máximo de PD evaluada o su equivalente en proteína cruda (~37%), fue seleccionado por ser el nivel máximo recomendado para el camarón blanco (ver la Tabla XIX), y a que se ha demostrado que una cantidad superior, es metabolizada en lugar de ser utilizada para crecimiento (Hu *et al.*, 2008).

La menor respuesta en crecimiento de los camarones que recibieron los alimentos con 18, 23 y 28% de PD pudiera explicarse parcialmente por la composición que se generó en la

formulación de los alimentos. Durante ese proceso se contempló una concentración de energía bruta relativamente similar para todos los alimentos, la cual quedó en un rango de 4.5 a 4.8 kcal/g. Sin embargo, la composición en ingredientes de los alimentos muestra que los niveles de harina de trigo fueron mayores en los alimentos con 18, 23 y 28% de PD con respecto al alimento con 33% de PD (30.5%). Como resultado de lo anterior, las distintas cantidades de harina de trigo usadas generaron niveles menores de extracto libre de nitrógeno, conforme se incrementa la PD en el alimento, lo cual corresponde a niveles más altos de carbohidratos solubles en los alimentos con menor nivel de PD.

Así, es probable que los niveles mayores de carbohidratos, más que la concentración de energía *per se* en los alimentos hayan inducido un menor consumo de alimento (Chuntapa *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2006), como fue demostrado en los resultados del presente trabajo y, como consecuencia, una ingesta menor de proteína, y por ende de aminoácidos, resultando en menores ganancias de peso en los tratamientos con 18, 23 y 28% de PD. De igual forma, el menor consumo de alimento induce una deficiencia de otros nutrimentos que son necesarios para un óptimo crecimiento (Guo *et al.*, 2006). También es probable que algunos aminoácidos en los alimentos hayan estado en niveles menores a lo recomendado para el camarón *L. vannamei*, ya que se ha sugerido (Tacon *et al.*, 2002) que el perfil de aminoácidos en los tejidos del camarón pueden ser usados como referencia para estudios de requerimientos. Esta recomendación debe tomarse con reserva, ya que no necesariamente el perfil de aminoácidos en los tejidos del camarón refleja la demanda real de los mismos. Millamena *et al.* (1999) demostraron que los requerimientos de leucina e isoleucina fueron menores a los encontrados en los tejidos del camarón *Penaeus monodon*, mientras que en el

caso de histidina, fenilalanina y triptófano, sí se encontró una correlación entre el requerimiento obtenido con los niveles encontrados de los mismos en los tejidos del animal.

Es altamente probable que, además de lo antes expuesto, el menor crecimiento de los camarones que recibieron los alimentos con 18 y 23% de PD se haya debido a que en la formulación de esos dos grupos de alimentos se utilizaron altas cantidades de ingredientes de origen vegetal (84.2 y 82.6%, respectivamente), los cuales, en general, son poco atractivos para el camarón (Cuzon *et al.*, 2004) y que además en los alimentos con 28 y 33% de PD se utilizó harina de cabeza de camarón (HCAM). Lo anterior permitió que esos dos grupos de alimentos fueran más atractivos, lo que se confirmó por observación directa, ya que los pellets de alimento eran tomados de inmediato por el camarón al momento de recibirlo, generando un mayor consumo ($P < 0.05$), dado que se ha demostrado que existe una preferencia del camarón por los alimentos que contienen harinas de crustáceos y, que aparentemente, como ha sido recomendado en la literatura, 0.05% de inclusión de ese tipo de ingredientes es suficiente para actuar como attractante (Smith *et al.*, 2005).

Cabe recordar que los alimentos utilizados en el presente estudio no contenían harina de pescado. No obstante, el efecto attractante no se observó en el alimento con 23% de PD en el cual se incorporó 1.63% de HCAM, ya que el consumo aparente de alimento en ese tratamiento fue similar al grupo que recibió el alimento con 18% de PD, que fue fabricado únicamente con ingredientes de origen vegetal, lo que parece ser no recomendable. Los pellets de los alimentos con 18 y 23% de PD eran tomados por el camarón al momento de

servirlo, pero rechazados posteriormente permaneciendo en el fondo, lo que modificó su apariencia inicial (cilíndrica) por una forma redondeada debido a su hidratación por el prolongado tiempo de inmersión antes de ser consumidos. Se ha sugerido que existe una relación directa entre la cantidad incorporada de ingredientes de origen marino en los alimentos con el nivel de consumo de los mismos (Molina-Poveda y Morales, 2004).

En cualquier caso, los resultados obtenidos sugieren que el nivel de 37% de proteína cruda (en base seca) o sus equivalentes en base húmeda de 33.3% de PC ó 33% de PD, fue el mejor nivel, puesto que generó los mayores pesos finales del experimento, realizado en condiciones de cultivo intensivo con agua clara y en ausencia de productividad natural en los acuarios. Lo anterior concuerda con el nivel de 35% de proteína cruda sugerido anteriormente por Akiyama y Dominy (1990) para las distintas especies de crustáceos peneidos, y con otros reportes que mencionan que el requerimiento de proteína cruda del camarón *L. vannamei* se encuentra entre 30 y 48% (Smith *et al.*, 1985; Shiau, 1998; Kureshy y Davis, 2002).

Los mejores resultados obtenidos aquí con el nivel alto de proteína, también concuerdan con lo reportado por Hu *et al.* (2008) quienes evaluaron, bajo condiciones de cultivo en laboratorio, alimentos con varios niveles de proteína cruda (30, 34, 38, 42%) que fueron combinados con tres niveles de lípidos cada uno (5.0, 7.5 y 10.0%). Los resultados de sus experimentos no mostraron diferencias en la ganancia de peso entre los grupos de camarones que recibieron los alimentos con 34% o más de proteína cruda.

En otro trabajo, Kureshy y Davis (2002) obtuvieron un óptimo de proteína para la ganancia de peso relativamente similar al que fue encontrado en el presente trabajo, ya que fueron estudiados tres niveles de proteína (16, 32 y 48%) en alimentos para juveniles y subadultos de *L. vannamei* cultivados en condiciones de laboratorio durante 28 días. Los autores concluyen que el alimento con 32% de proteína indujo un mejor crecimiento tanto en los juveniles como en los subadultos de camarón, además de resaltar el hecho de que el requerimiento absoluto, es similar en juveniles de camarón que consumen alimentos con 32 y 48% de proteína (46.4 y 43.4 g/día/kg camarón, respectivamente). Sin embargo, se determinó que existe efecto positivo, con una mejora en la conversión alimenticia, cuando se utilizó el alimento con 42% de proteína.

Por otra parte, en experimentos desarrollados con juveniles de camarón blanco, tanto en acuarios en laboratorio, como en estanques al aire libre (Venero *et al.*, 2007), se comparó el efecto de dos niveles de proteína cruda (32 y 42%) equivalentes a 22 y 31% de proteína digerible, y se encontró que es factible reducir la cantidad de alimento ofrecido conforme se incrementa la densidad de nutrientes en el alimento, así como que se puede lograr un desempeño similar en la ganancia de peso entre organismos que fueron alimentados con un alimento con 42% de proteína y con un nivel de consumo equivalente al 75% de lo consumido *ad libitum* por camarones alimentados con 32% de proteína cruda.

Las diferencias en peso que se obtuvieron en los camarones alimentados con los distintos niveles de proteína digerible del presente trabajo, contrastan con los resultados obtenidos por Gómez-Jiménez *et al.* (2005) quienes cultivaron juveniles de *L. vannamei* (peso inicial

promedio de 1.29g) en acuarios de vidrio, sin realizar recambios de agua, y no encontraron diferencias en la ganancia de peso al probar alimentos comerciales con concentraciones de proteína de 25, 30, 35 y 40%, lo cual fue atribuido a la contribución de proteína microbiana en condiciones de cero recambio de agua. El efecto benéfico de eliminar el recambio de agua sobre una mayor contribución microbiana a la economía proteica es un proceso que ya ha sido bien estudiado (Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002).

En otro trabajo, González-Félix *et al.* (2007) reportan que los mismos niveles de proteína cruda en los alimentos antes mencionados, fueron comparados en juveniles de camarón blanco (peso inicial de 0.68g) cultivados en condiciones de cero recambio de agua, sin que los camarones presentaran diferencias en el peso final y supervivencia, aunque se obtuvo un mejor desempeño en los camarones alimentados con 25% de proteína, que alcanzaron los 3.11 g de peso después de cuatro semanas de experimentación.

Por su parte, Pérez-Velázquez *et al.* (2008) demostraron que la inclusión de proteína cruda en concentraciones de 25, 30, 35 y 40% en el alimento para camarones *L. vannamei* con peso promedio inicial de 0.355 g, y al ajustar el consumo de alimento, a fin de obtener concentraciones iguales de proteína (60 g por kilogramo de peso vivo) por un período de 28 días, no generó diferencias en la ganancia de peso final o en la tasa de crecimiento, entre dos grupos de camarones alimentados con 35 y 40% de proteína (1.13 vs 1.21g de peso final), ni entre otros dos tratamientos que recibieron 25 y 30% de proteína en sus alimentos con un peso final de 1.96 y 2.09 g, respectivamente.

El mejor nivel de proteína encontrado aquí también es congruente con los resultados obtenidos por Huai *et al.* (2010), quienes compararon 4 niveles de proteína cruda (35.5~41.3) o sus equivalentes en proteína digerible (29.8~35.3%), encontrando que es factible reducir el nivel de ese nutrimento en el alimento en juveniles de camarón blanco sin afectar su rendimiento productivo, siempre y cuando sean suplementados los aminoácidos limitantes, tales como la metionina, la lisina y la treonina.

En décadas anteriores, la industria de alimentos balanceados para animales terrestres empleaba como criterio para la formulación la concentración total de proteína en el alimento (Fernández, 1996) en lugar de formular para mejorar el perfil de aminoácidos esenciales, meta hacia la que se pudo avanzar con el uso de aminoácidos cristalinos hasta que se inició la oferta comercial de los mismos. Ello ocurrió primero con el uso de metionina para la alimentación de aves (González y Pesti, 1994), y posteriormente, con lisina y treonina para la producción de cerdos (Cuarón, 1993). En el presente experimento se utilizó la DL-metionina cristalina grado alimenticio, la que es empleada en la industria de alimentos balanceados, lo que supone su continua oferta en el mercado de alimentos a un precio que permita la rentabilidad de la industria de alimentos para camarón.

En el caso de la acuicultura, la producción intensiva de peces está más avanzada en el tema del uso de aminoácidos en la formulación de alimentos, mientras que en el caso del camarón se ha generado una gran controversia sobre el uso de aminoácidos cristalinos en los alimentos, ya que se asume que existe una importante lixiviación de los aminoácidos

hacia el agua con la inmersión y la manipulación del alimento por parte del camarón, antes de su ingestión (Cruz-Suárez *et al.*, 2005).

Al respecto, se han propuesto estrategias para reducir la lixiviación de los aminoácidos cristalinos en el agua por medio del uso de sustancias aglutinantes, con resultados positivos en la respuesta de crecimiento del camarón (Millamena *et al.*, 1996,1997, 1998, 1999).

En el presente trabajo se utilizó carboxi-metil-celulosa con la idea de reducir el potencial problema de lixiviación en los alimentos evaluados, ya que se ha demostrado que ese es uno de los compuestos que se han sido útiles para mejorar el uso de los aminoácidos cristalinos en alimentos para camarón (Millamena *et al.*, 1999).

En ese sentido, se ha reportado (Lim, 1993) que después de una hora en el agua, se presentan pérdidas de proteína cruda que varían entre 7 y 25.5%, así como de distintos aminoácidos; por ejemplo, se encontró una merma en histidina de 4.8% y en metionina de 53.2%, en 5 alimentos con distinto pH, adicionados con una mezcla de aminoácidos cristalinos (16% de inclusión), mientras que en un alimento control fabricado a base de harina de calamar y pasta de cacahuete, solo hubo pérdidas de 7% de metionina y de 11% de arginina. La hidroestabilidad promedio en ambos alimentos fue de 79% en los 5 alimentos con aminoácidos cristalinos, y de 92% en el alimento control.

En los 17 ingredientes estudiados aquí en las pruebas de digestibilidad de aminoácidos, la hidroestabilidad de la materia seca de los alimentos que los contenían fluctuó entre 93.4% y

98.9%, con excepción del concentrado proteico solubles de pescado (89.6%), lo que supone que los resultados de digestibilidad son razonablemente aceptables, a pesar de que no se pudieron cuantificar las pérdidas por lixiviación de los aminoácidos durante el bioensayo de digestibilidad. Al respecto, Cruz-Suárez *et al.* (2005) reportaron en 6 alimentos comerciales para camarón blanco, que las pérdidas por lixiviación de proteína cruda variaron de 6 a 13%, mientras que las de metionina de 6.5 a 13%, y de lisina de 10 a 16.5%. La variabilidad en los parámetros evaluados fue atribuida a las propiedades de solubilidad de la proteína de los alimentos y a las propiedades aglutinantes de los ingredientes utilizados en su fabricación.

En el presente trabajo, un posible efecto de la lixiviación se observó, siendo más marcado en el concentrado proteico de solubles de pescado ya que en ese ingrediente se encontró una digestibilidad tanto de la materia seca, como de la proteína cruda, superior al 100%, cuando en teoría, los valores de digestibilidad no debieran ser mayores al 100%. Es factible suponer que se debe a la lixiviación, resultando en una sobrestimación de los valores de digestibilidad encontrados. Sin embargo, hay información que indica que también existen pérdidas metabólicas de aminoácidos vía urinaria, como se demostró en el camarón *Penaeus monodon* (Liou *et al.*, 2005), en particular cuando éste es alimentado con fuentes cristalinas de aminoácidos, con pérdidas de 6% en total, con mermas mayores de 13.6% para histidina, 17.6% para fenilalanina, 8% para lisina, isoleucina y leucina, y 10% en valina. Así mismo, pueden existir otras pérdidas por vía de la orina en esos mismos nutrimentos afectados por la reacción de Maillard (Fernández, 1996).

Los aglutinantes o sustancias protectoras de los aminoácidos cristalinos pueden ser adicionados en dos formas: la primera es directamente al aminoácido, y la segunda, incorporando esos compuestos a la mezcla total de ingredientes que conforman el alimento al momento de su fabricación (Alam *et al.*, 2004, 2004a, 2005). En el presente experimento, se optó por proteger la DL-metionina antes de su incorporación a los alimentos experimentales, lo cual no pudo ser confirmado en laboratorio. Sin embargo, la respuesta en el crecimiento del camarón ante los distintos niveles de metionina evaluados, permiten afirmar que sí pudo ser utilizada para su crecimiento.

Existe información que indica que posiblemente la alta tasa de lixiviación que se presenta en los trabajos sobre requerimientos, se debe más al uso de dietas purificadas, que a la cantidad de cada aminoácido utilizado *per se* (Huai *et al.*, 2010). Por ejemplo, Chi *et al.* (2009) evaluaron tres métodos de protección de L-metionina cristalina, sin encontrar diferencias entre los tratamientos en donde se protegió al aminoácido y el tratamiento en donde se utilizó al aminoácido en forma directa; esto concuerda con los resultados benéficos sobre el peso final de camarones, obtenidos con la adición de aminoácidos sin proteger (metionina, lisina y treonina) a alimentos bajos en proteína (Huai *et al.*, 2010).

Otros trabajos sustentan lo descrito en el párrafo anterior, ya que los experimentos de Forster y Dominy (2006) para comparar la eficiencia de tres fuentes de metionina cristalina (L-metionina, DL-metionina y HMTBA) para el camarón *L. vannamei* fue desarrollado sin utilizar alguna sustancia de protección para los análogos de metionina evaluados, ni tampoco para otros aminoácidos (L-arginina, L-lisina HCl, L-treonina y L-ácido glutámico

HCl) que fueron utilizados en la formulación; con ello se obtuvo como resultado que las tres formas cristalinas tienen la misma eficiencia para el crecimiento del camarón. Es importante mencionar que la solubilidad de cada aminoácido cristalino a emplear es un factor importante a considerar, como lo establecen Huai *et al.* (2010).

Por su parte Fox *et al.* (2009), utilizaron en un alimento para *L. vannamei*, 18 aminoácidos cristalinos, sin ser protegidos previamente, con el objetivo de evaluar si existía efecto del uso de proteína completa (natural) o proteína de aminoácidos cristalinos sobre el perfil de aminoácidos contenidos en los tejidos del músculo de la cola del camarón. De dicho trabajo se concluyó que los aminoácidos cristalinos del alimento fueron utilizados a una tasa de absorción muy cercana a la del alimento control con proteínas completas, ya que se aseguró una alta estabilidad de los alimentos en el agua, un rápido y completo consumo de alimento, lo que se consiguió con el ayuno previo (24 h) de los camarones antes de recibir los alimentos que fueron evaluados.

Fox (2009) reportó que el nivel óptimo de metionina en alimento para el camarón blanco es de 0.66%, sin mencionar que se haya protegido al aminoácido DL-metionina, encontrando una buena respuesta en las variables productivas del camarón al emplear 15 raciones alimenticias al día, lo que contrasta fuertemente con las dos raciones usadas en el bioensayo de crecimiento del presente trabajo, aunque esta última situación se asemeja más al cultivo comercial.

De igual manera, Huai *et al.* (2010) compararon distintos alimentos bajos en proteína y harina de pescado, con el uso de cantidades crecientes de pasta de soya, generando un déficit de metionina, lisina y treonina en los alimentos, que fue compensado usando metionina MHA (metionina-hidroxi-análogo), L-lisina sulfato y L-treonina en forma cristalina, sin protección. Los resultados demostraron que los camarones (*L. vannamei*) que consumieron alimento con menos proteína y harina de pescado, pero con aminoácidos cristalinos, tuvieron un desempeño similar al de los organismos que recibieron más proteína y harina de pescado, y una respuesta productiva superior al observado con alimentos sin la adición de los aminoácidos.

En el caso de los resultados encontrados aquí, estos parecen indicar que hubiera sido conveniente la suplementación de lisina, arginina y treonina en los alimentos con 18%, 23% y 28% de PD, lo cual también podría explicar que se obtuvieran pesos inferiores en esos tratamientos con respecto a los encontrados en los camarones alimentados con 33% de PD, lo cual no se pudo constatar por medio del análisis de aminoácidos de los alimentos experimentales, pero se debe señalar que el análisis calculado de los mismos se obtuvo con los resultados del análisis previo de los ingredientes antes del bioensayo de digestibilidad.

En la Tabla VI se puede apreciar la composición de los alimentos experimentales y el aporte calculado tanto de proteína digerible como de metionina total utilizados en la formulación. En relación con el criterio utilizado en la formulación, es oportuno aclarar que, al momento en que se diseñaron los alimentos y se llevó a cabo el presente experimento, no existía información precisa sobre las necesidades del primer aminoácido

limitante esencial (metionina) para los alimentos de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, lo cual ya había sido planteado por Forster *et al.* en el año 2006. No fue sino hasta el 2009, en que Fox *et al.*, (2009) publicaron una primera recomendación sobre un nivel óptimo de metionina (0.66%) en esa especie de camarón.

Se ha demostrado que existe una alta correlación entre el perfil de aminoácidos contenidos en la proteína de los tejidos del camarón *L. vannamei* y los aminoácidos que deben incluirse en su alimento (Mente *et al.*, 2002). De ahí que se ha planteado que el requerimiento de aminoácidos para el camarón blanco debe ser muy cercano al perfil de aminoácidos contenido en los tejidos del animal, por lo cual, ese criterio se ha utilizado como referencia para el proceso de formulación de sus alimentos (Tacon *et al.*, 2002). A pesar de que ese conocimiento es una herramienta útil, puede ser cuestionable, ya que aparentemente existen factores que pueden modificar el perfil de aminoácidos (metionina, lisina, arginina, treonina, entre otros) en los tejidos en algunas especies de camarón (*Penaeus semisulcatus* y *Metapenaeus monoceros*) como lo son las variaciones estacionales (Yanar y Celic, 2006). Además, se ha informado que puede haber una importante variación entre perfiles de aminoácidos encontrados en distintos tejidos de una misma especie de camarón (*L. vannamei*) bajo condiciones de cautiverio en laboratorio, cuando los animales recibieron un alimento deficiente en algunos aminoácidos esenciales, en comparación de otro alimento con un mayor valor biológico para el mismo camarón (Mente *et al.*, 2002).

Al respecto, en la Tabla XIX se presentan algunos perfiles de aminoácidos que fueron tomados como referencia para la formulación de los alimentos fabricados para el desarrollo

del presente experimento, con excepción de trabajo de Huai *et al.* (2010) que fue publicado posteriormente. En la primera columna se puede apreciar el perfil de aminoácidos que fue recomendado (Akiyama *et al.*, 1991) para los alimentos de todas las especies de peneidos. El nivel de cada aminoácido esta expresado como porcentaje de la proteína cruda en el alimento, el cual se podría modificar con respecto a la cantidad de proteína cruda en el alimento sin modificar la proporción antes planteada.

Tabla XIX. Comparación del perfil de aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína) en tejidos y alimentos de camarón *Litopenaeus vannamei*.

	Akiyama ¹ <i>et al.</i> (1991)	Forster ² <i>et al.</i> (2002)	Tacon ² <i>et al.</i> (2002)	Huai ³ <i>et al.</i> (2010)	Bioensayo de crecimiento en el presente trabajo ³			
PC%	36.0	35.0	35.0	35.5	20.1	25.2	32.0	36.9
PD%	—	—	—	29.8	18.0	23.0	28.0	33.0
Lisina	5.30	4.84	5.35	6.61	4.21	3.04	3.72	4.55
Histidina	2.10	1.62	2.16	2.62	3.46	3.35	3.45	2.41
Arginina	5.80	6.10	9.70	6.61	5.36	4.44	5.60	6.94
Treonina	3.60	2.52	4.00	4.05	3.04	2.75	2.99	3.43
Metionina	2.40	—	2.13	1.77 ⁴	1.43 ⁵	1.54 ⁵	1.62 ⁵	1.74 ⁵
Met + Cis	3.60	2.64	—	2.89	3.06	3.40	3.24	3.43
Fenilalanina	4.00	—	4.97	4.73	5.02	5.20	5.16	5.59
Fen + Tir	7.10	5.39	—	7.25	8.47	8.54	8.60	8.93
Isoleucina	3.40	2.65	4.13	3.24	4.41	4.29	4.48	5.01
Leucina	5.40	4.69	7.13	7.18	7.03	6.87	6.94	7.62
Valina	4.00	3.10	4.57	4.45	4.71	4.49	4.64	5.17

¹Recomendado en el alimento para todas las especies de peneidos. ²En tejidos de *L. vannamei*. ³En alimento para *L. vannamei*. ⁴Nivel basal para adicionar los dos niveles evaluados de MHA-Ca. ⁵Nivel basal para adicionar los cuatro niveles de DL-metionina protegida, evaluados. Met + Cis = metionina + cistina (no esencial).

En lo que se respecta a las columnas 2 y 3, la información publicada por Forster *et al.*, (2002) y Tacon *et al.* (2002), donde se detalla el perfil de aminoácidos esenciales presente en los tejidos de *L. vannamei*, puede ser útil como referencia para la formulación de alimentos. Sin embargo, a pesar de que el perfil analizado proviene de la misma especie de camarón, todos los valores presentados como porcentaje de la proteína son menores en los datos que presentan Forster *et al.* (2002) con respecto a los sugeridos por Tacon *et al.* (2002), donde por ejemplo, en los casos de lisina, histidina, arginina y lisina existen diferencias entre los perfiles de aminoácidos propuestos por ambos autores de 9.5, 25, 37 y 37%, respectivamente. Lo anterior representa un problema relativo a la certidumbre sobre qué base de datos utilizar como referencia cuando uno lo requiere, ya que puede haber variaciones debidas a diferencias entre especies, la edad del camarón, tejidos usados para el análisis y el análisis por sí mismo (Conklin, 2004).

2.2 Efecto del nivel de metionina

Para la incorporación de los cinco niveles de metionina cristalina (0.00, 0.17, 0.33, 0.50 y 0.66%) a cada uno de los cuatro niveles de PD, se tomó como criterio para el proceso de formulación usado aquí, que los porcentajes de metionina inicial calculada (antes de incorporar DL-metionina) en los alimentos PD 18, PD 23, PD 28 y PD 33% fueran lo más bajo posibles, quedando en 0.25, 0.35, 0.45 y 0.55%, respectivamente, y que, expresados como porcentaje de la PC, fueran de 1.43, 1.54, 1.62 y 1.74%, respectivamente (Tabla XX). De esta forma, se logró obtener una concentración de metionina para cada porcentaje de PD menor al nivel de metionina sugerido por varios autores (Akiyama y Dominy, 1991; Forster *et al.*, 2002; Tacon *et al.* 2002), así como lo reportado por Cuzon *et al.* (2004) como el

nivel óptimo de metionina (2.4%) para el camarón *P. monodon* o las cantidades usadas por Forster y Dominy (2006) con juveniles del camarón blanco. Se debe recordar que al momento de iniciar el bioensayo de crecimiento realizado aquí, no se había establecido todavía un requerimiento de metionina en esa especie de camarón (Forster y Dominy, 2006) y que si los alimentos control eran deficientes en metionina, al adicionar ésta se vería la respuesta positiva de cubrir el requerimiento.

Los resultados generados en el presente experimento, por efecto de los distintos niveles de metionina evaluados en los alimentos, indicaron por medio de un modelo de regresión lineal, que es factible obtener una mayor respuesta de crecimiento en peso de los camarones con un nivel de metionina total superior al 1.15% en el alimento, valor máximo evaluado aquí.

El nivel máximo de metionina evaluado en este experimento es superior a lo que previamente había sido reportado por Millamena *et al.* (1996), quienes establecieron que el requerimiento de metionina para poslarvas del camarón tigre (*Penaeus monodon*) era de 0.89% del alimento ó 2.4% de la concentración de proteína cruda en el alimento, mientras que en el caso de la cistina, los mismos autores recomendaron un nivel de 0.41% del alimento, determinando que el nivel de aminoácidos azufrados (metionina + cistina) era de 1.3% del alimento ó 3.5% de la proteína. Sin embargo, el que exista una demanda de metionina total superior al nivel de 1.15% usado aquí, concuerda con lo sugerido en el trabajo de Chi *et al.* (2009), ya que usaron un nivel de metionina del 1.28%.

En la Tabla XX, se presenta una síntesis de los resultados generados en distintos trabajos de investigación para establecer la mejor respuesta a niveles de análogos de metionina sobre el crecimiento en juveniles de *L. vannamei*.

Tabla XX. Respuesta en peso a la metionina cristalina sin proteger incorporada en el alimento (base húmeda) en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* en distintos bioensayos.

Fuente de metionina	PC (%)	C	Nivel (%)	Peso inicial (g)	Tiempo (días)	Peso final (g)	Comidas /día	Referencia
MHA	33.0	L	0.82	1.20	56	4.6	NE	Vázquez-Añón y Giesen (2004)
L-Met	30.5	A	0.92	1.52	70	11.5	Continua	Forster y Dominy (2006)
DL-Met			0.90			11.8		
MHA			0.97			11.5		
L-Met	24.0	NE	0.66	0.41	28	2.87	15	Fox <i>et al.</i> (2009)
L-Met*	33.7	L	1.28	0.81	50	8.89	4	Chi <i>et al.</i> (2009)
MHA	35.5	L	0.77	0.36	70	5.95	3	Huai <i>et al.</i> (2010)
DL-Met	33.2	L	0.85	0.25	44	5.21	2	Presente estudio

PC = Proteína Cruda. C = condiciones de cultivo (A = aire libre, L = laboratorio). *En alimento control, no hubo diferencias o una respuesta superior en el peso en otros tratamientos usando L-Met protegida con 3 métodos distintos. MHA = ácido 2-hidroxi-4-metil-tio-butanoico. NE = No especificado.

El nivel máximo de metionina usado aquí (1.15%) en el alimento con 33% de PD, es mayor al recomendado por Akiyama y Dominy (1991) quienes establecieron, de manera general, que la concentración metionina en el alimento para las distintas especies de camarón debía ser de 0.84% en base húmeda en alimentos con 35% de proteína cruda, y por Tacon *et al.* (2002) para *L. vannamei* en alimentos con 35% de proteína. Sin embargo, el valor obtenido

aquí es más cercano al sugerido por Chi *et al.* (2009) quienes recomiendan 1.28% de metionina en alimentos con 34% de proteína.

En un experimento de ocho semanas realizado (Vázquez-Añón y Giesen, 2004) con camarones *L. vannamei* con peso inicial de 1.2 g, se evaluaron cuatro niveles (0.0%, 0.1%, 0.2% y 0.3%) de metionina hidroxianálogo (MHA ó ácido 2-hidroxi-4-metil-tio-butanoico) los cuales fueron incorporados a un alimento basal de referencia con 26% de pasta de soya, 0.60% de metionina y 33% de proteína cruda, incluyendo en el alimento basal las formas cristalinas de arginina, lisina y treonina, con la finalidad de obtener niveles comparables de esos aminoácidos a los encontrados en un alimento comercial. Al final del experimento, a pesar de que no encontraron diferencias de peso entre los tratamientos evaluados, si se observó una mejora en la ganancia de peso conforme se incrementó el nivel de MHA (hasta 0.80%) en el alimento, con un peso final de 4.6 g después de 56 días de cultivo, el cual fue inferior al peso alcanzado (5.2 g) por los camarones en los 44 días del presente experimento, iniciado con organismos con peso promedio inicial 0.248 g.

En lo que corresponde al contenido de proteína en el músculo de la cola de los camarones, las diferencias encontradas en los resultados del presente bioensayo, contrastan con lo reportado por Hu *et al.* (2008), quienes probaron con *L. vannamei* (90 mg de peso inicial) cultivado en acuarios de concreto en laboratorio y alimentados con cuatro niveles de proteína cruda (30, 34, 38 y 42%). Estos autores no encontraron diferencias en la cantidad de proteína retenida en el músculo abdominal de camarones después de 70 días de experimentación.

Resultados similares a los anteriores fueron publicados (Venero *et al.*, 2007) en experimentos desarrollados en laboratorio con juveniles de camarón blanco, usando alimentos con 32 y 42% de proteína cruda (22 y 31% de proteína digerible), ya que no hubo diferencia en la concentración de proteína corporal en ninguno de los tratamientos evaluados, los cuales consistieron de un alimento de 42% de PC, bajo un régimen de restricción alimenticia (75%) con respecto a otro con 32% de proteína ofrecido *ad libitum*.

Las diferencias encontradas en los dos trabajos antes mencionados con respecto a lo encontrado aquí posiblemente se deba a que en los alimentos con menor proteína digerible (18 y 23%) hubo un menor consumo de alimento (0.076 y 0.68 g/día, respectivamente) ya que fueron los alimentos con mayor nivel de ingredientes de origen vegetal. También es factible suponer que se presentaron posibles deficiencias de aminoácidos en los mismos, ya que los alimentos con 18%, 23% y 28% de PD mostraron niveles marginales de lisina y arginina con respecto a los perfiles recomendados por Akiyama *et al.* (1991), Forster *et al.* (2002), Tacon *et al.* (2002) y a los usados por Huai *et al.* (2010) o marginales en treonina con respecto a lo sugerido por Akiyama *et al.* (1991), Tacon *et al.* (2002) y por Huai *et al.* (2010), lo cual repercutió en una menor deposición de proteína en el músculo de la cola del camarón.

CONCLUSIONES

- 1) Se detectaron diferencias marcadas en la digestibilidad aparente de materia seca, proteína y aminoácidos esenciales entre los diversos ingredientes evaluados. La variabilidad en la digestibilidad aparente de los ingredientes se debe a diversos factores no controlados, como la especie utilizada, el origen de la materia prima, el grado de frescura, su composición química, la época de captura y los métodos de procesamiento (cocción, presión, secado, etc.), lo cual refuerza la hipótesis de que es necesario conocer el grado de utilización de los nutrimentos por parte del camarón, a fin de poder hacer formulaciones más precisas y alimentos amigables con el medio ambiente.

- 2) El concentrado proteico de solubles de pescado, las harinas de cabeza de camarón, de calamar, de desechos de almeja catarina y de sardina entera (HPA), fueron las fuentes de proteína más digeribles (>85%) de los ingredientes de origen marino, mientras que la harina de trigo, la pasta de soya, la caseína, el gluten de trigo y la harina de subproductos avícolas fueron los ingredientes de origen terrestre con mejor digestibilidad de proteína para el camarón. Con base a lo anterior, se considera son buenas opciones para la formulación y fabricación de alimentos para juveniles del camarón blanco.

- 3) Los niveles de proteína digerible evaluados generaron importantes diferencias en la ganancia de peso entre los camarones de los distintos tratamientos. El nivel de 33% de proteína digerible en los alimentos permitió obtener los mejores resultados de

crecimiento y utilización del alimento, mientras que los niveles de 18%, 23% y 28% tuvieron resultados muy inferiores. Este efecto pudo ser consecuencia no sólo del nivel de proteína *per se*, sino también del bajo consumo registrado con estos últimos alimentos, resultando en posibles deficiencias de aminoácidos esenciales como lisina, treonina y arginina.

- 4) La suplementación de DL-metionina a los alimentos con 28% y 33% de PD permitió obtener un mejor desempeño en los parámetros zootécnicos del camarón blanco, donde a mayor nivel de metionina, mayor fue el crecimiento, mientras que en los alimentos con 18% y 23% de PD no se encontró respuesta por la adición de metionina. Lo anterior, posiblemente debido al bajo consumo registrado con esos alimentos, resultando en deficiencias de otros aminoácidos esenciales.
- 5) El análisis de regresión lineal para el peso final indicó que pudiera haber una mayor respuesta de crecimiento en peso con un nivel de metionina mayor al 1.15% y/o un nivel mayor al 33% de proteína digestible, que fueron los niveles máximos evaluados aquí.

RECOMENDACIONES

- 1) Es importante evaluar en futuros trabajos la adición de otras fuentes cristalinas de aquellos aminoácidos que pudieran encontrarse en concentraciones marginales en el alimento para permitir el máximo rendimiento del camarón.

- 2) Es recomendable realizar pruebas de consumo de los alimentos, previo a los experimentos de crecimiento, para evitar que el consumo se comporte como una variable dependiente.

- 3) Medir la concentración de aminoácidos en los alimentos utilizados para evaluar los requerimientos nutricios del camarón, y determinar la lixiviación de proteína y aminoácidos cuando se incluyan aminoácidos libres o protegidos.

LITERATURA CITADA

- Abe T., Miyashita K. 2007. Heat treatment of scallop adductor muscle using superheated steam. *J. of Food Sci.* Vol. 72 (6), E345-E350.
- Akiyama D.M., Coelho S.R., Lawrence A.L., Robinson E.H. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* BOONE. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(1), 91-98.
- Akiyama D.M. 1990. The use of soy products and other plant protein supplements in aquaculture feeds. American Soybean Association, Singapore. p. 2.
- Akiyama D.M., Dominy W.G. 1990. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. *Texas Shrimp Farming Manual Vol. 1: Growth-out Technology. Technical Report of Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M Sea Grant College Program.* Corpus Christi, Texas, USA. p. 13.
- Akiyama D.M. 1991. Penaid shrimp nutrition for the commercial feed industry. In: Akiyama, D.M. and Tan, R.K.H (Eds.). *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop.* Thailand - Indonesia, September 19-25, pp. 80-98.
- Akiyama D.M. 1991a. Soybean meal utilization by marine shrimp. In: Akiyama, D.M. and Tan, R.K.H (Eds.). *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop.* Thailand - Indonesia. September 19-25, pp. 207-225.
- Akiyama D.M., Dominy W.G., Lawrence A.L. 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices* (Fast, A.L. & Lester, L.J. eds.), Elsevier Science Publishing Inc., New York, NY, USA. pp. 535-568.

- Akiyama D.M. 1993. Semi-extensive shrimp farm management. ASA Technical Bulletin, MITA (P) No.518/12/92, Vol. AQ. 38 1993/3. American Soybean Association, Singapore, 20 pp.
- Alam M.S., Teshima S., Ishikawa M., Hasegawa D., Cosio S. 2004. Dietary arginine requirement of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate). Aquaculture Research, 35, 842-849.
- Alam M.S., Teshima S., Koshio S., Ishikawa M. 2004a. Effects of supplementation of coated crystalline amino acids on growth performance and body composition of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Aquac. Nutr., 10(5): 309-316.
- Alam M.S., Teshima S., Koshio S., Ishikawa M., Uyan O., Hernandez L. H., Michael F.R. 2005. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture, 248, 13–19.
- Anderson J. S., Higgs D.A., Beames R.M., Rowshandeli M. 1997. Fish meal quality assessment for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in sea water. Aquac. Nutr., 3, 25–38.
- AOAC 2005. Official methods of analysis of AOAC International. Amino acids in feeds. 18th. ed. W. Horwitz and G. Latimer. Association of Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland, Virginia, USA. 8-24 pp.

- Arzel J., Guillaume J., Kausshik S.J., 1999. Composition et valeur nutritive des matières première utilisées, in: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. Métailler, R. (Eds.), Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. INRA Editions, Infremer. Paris, France. pp.441-455.
- Baker D.H., Easter R.A.. 1976. Soy protein as a source of amino acids for non ruminant animals. In: L.D. Hill (Ed.) World soybean research. Interstate Printers and Publishers, Danville, IL,U.S.A. pp. 969-976.
- Baker D.H. 1997. Ideal amino acid profiles for swine and poultry and their applications in feed formulation. FERMEX. Technical Review-9. pp. 1-21. Nutri-Quest, Inc. Chesterfield, MO, U.S.A.
- Baker D.H. 2005. Comparative nutrition and metabolism: Explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Indianapolis, IN, USA July 24-28. PNAS, 102,17897-17902.
- Baker D.H. 2007. Lysine, arginine, and related amino acids: An introduction to the 6th amino acid assessment workshop. J. Nutr. 137:1599S–1601S.
- Bligh G.E., Dyer J.W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37(3), 911-917.
- Bonn G.D., Elmhorn D.D., Ludwigshafen G.G., Celle H.H., Cuxhaven K.K., Hanau H.T. 1991. Los aminoácidos en la nutrición animal. DEGUSSA. Frankfurt, Alemania.

- Bortone, E., Behnke K., Dominy W. 1995. Effects of mixtures of soybean meal, whole wheat flour, and whole wheat flour plus gluten and pelleting processing conditions on growth of juvenile marine shrimp (*Penaeus vannamei*) fed isonitrogenous diets. U.S. Wheat Associates. Republic of Singapore.
- Brill Formulation™ 2004. Software V.1.35.003. Feed Management Systems. Atlanta, GA, U.S.A.
- Brunson J.F., Romaine R.P. 1994. Digestibilidad de ingredientes alimenticios para el camarón blanco *Penaeus setiferus*. En: Mendoza Alfaro, R., Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D. (Eds.). Memorias del II Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 7-9 Noviembre. Monterrey N.L., México. pp. 231-233.
- Brunson J.F., Romaine R.P., Reigh R.C. 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquac. Nutr.*, 7, 9-16.
- Bureau D.P., Hua K. 2006. Letter to the editor of *Aquaculture*. *Aquaculture*, 252, 103-105.
- Burford M.A., Williams K.C. 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture*, 198, 79-93.
- Burford M.A., Smith D.M., Tabrett S.J., Coman F.E., Thompson P.J., Barclay M.C., Toscas P.J. 2004. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp, *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquac. Nutr.*, 10, 15-23.
- CANACINTRA. 2004. Sección de alimentos balanceados para animales. Panorama de la industria de alimentos balanceados en México. Documento Power Point. www.canacintra.com.mx

- Carrillo Domínguez S. 1993. Aprovechamiento de la langostilla *Pleuroncodes planipes* Stimpson como fuente de proteína y pigmento en pollos de engorda y gallinas en producción. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis de maestría. p. 94.
- Castro-González M.I., Carrillo-Domínguez S., Pérez-Gil Romo F., Calvo-Carrillo C. 1995. Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos. In: Auriol-Gamboa, D., Balart E.F. (Eds.). La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.C., pp. 163-178.
- Casillas-Hernández R., Magallón-Barajas F., Portillo-Clark G., Páez-Osuna F. 2006. Nutrient mass balances in semi-intensive shrimp ponds from Sonora, Mexico using two feeding strategies: Trays and mechanical dispersal. *Aquaculture*, 258, 289-298.
- Chávez M.C., Higuera I. 2003. Manual de buenas prácticas de producción acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA. p. 40. Mazatlán, Sin., México.
- Cheng Z.J., Behnke K.C., Dominy W.G. 2002. Effects of poultry by-product meal as a substitute for fish meal in diets on growth and body composition of juvenile pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Appl. Aquac.*, 12, 1, 71-83.

- Chi S.Y., Tan B.P., Lin H.Z., Mai K.S., Ai Q.H., Wang X.J., Zhang W.B., Xu W., Liufu Z.G. 2009. Effects of supplementation of crystalline or coated methionine on growth performance and feed utilization of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 15, 1-9.
- Cho C.Y., Slinger S. 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: Halver J.E., Tiews, K. (Eds.). *Finfish Nutrition and Technology*, Vol. II. Heenemann GmbH, Berlin, Germany. pp. 239-247.
- Cho C.Y., Cowey C.B., Watanabe T. 1985. *Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development*. Ottawa, Ont., Canada. IDCR-233e, 154 p.
- Civera R., Guillaume J.C., 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 77, 145-156.
- Civera R., Goytortúa E., Rocha S., Vega F., Nolasco H. 1998. Proyecto Langostilla Roja: Utilización de la langostilla roja como insumo proteico en alimentos para camaronicultura. Proyecto Piloto. Promotora Industrial Acuasistemas, S.A. - Federación de Sociedades Cooperativas Pesqueras de Baja California - CIBNOR. Informe Ejecutivo No. 2. Febrero. pp. 1-86.
- Chuntapa B., Piyatiratitivorakul S., Nitithamyong C., Viyakarn V., Menasveta P. 1999. Optimal lipid:carbohydrate and protein:energy ratios in semi-purified diets for juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquac. Res.*, 30, 825-830.

- Conklin D. 2004. Use of soybean meal in the diets of marine shrimp. Department of Animal Science, University of California, Davis. Technical review papers written in cooperation with the United Soybean Board and American Soybean Association. St. Louis, MO, USA. p. 14.
- Coon C. 2004. The ideal profile amino acids requirements for broilers, layers, and broilers breeders. American Soybean Association. United Soybean Board. Brussels, Belgin. pp. 1-43. www.asa-europe.org. Consultado en enero de 2008.
- Córdova-Murueta J.H., Garcia-Carreño F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in feed (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157, 249-260.
- Coward-Kelly G., Agbogbo F.K., Holtzapple M.T. 2006. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digerible animal feed. *Bioresource Tech.*, 97, 515–1520.
- Cromwell G. 1998. Presentación de las recomendaciones nutricionales del NRC para porcino. Estudio critico. XIV Curso de Especialización FEDNA. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. España. Fundación España para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Eds: P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Fira de Barcelona, España.
- Cruz- Suárez L.E., Ricque-Marie D., Pinal-Mansilla J.D, Wesche-Ebellling P. 1994. Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture*, 123, 349-360.

- Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Nieto-López M., Tapía-Salazar M. 1998. Revisión sobre calidad de harinas y aceites de pescado para la nutrición del camarón. pp 298-326 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada C.J., Ricque-Marie D. Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18. La Paz, B.C.S., México. pp. 298-326.
- Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., McCallum I.M., 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.
- Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Marín-Zaldivar L.F., Guajardo-Barbosa C., Nieto-López M., Salinas-Miller A. 2002. Historia y estatus actual de la digestibilidad y de algunas características fisicoquímicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds.). Avances en Nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. pp. 1-22.
- Cruz-Suárez E., Hernández C. 2004. Evaluación del reemplazo de harina de pescado con harinas de origen avícola y porcina en la alimentación de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Reciclaje de subproductos animales estadounidenses No. 16. Nacional Renderers Association, Inc. América Latina. México, D.F., México. pp. 1-37.

- Cruz-Suárez L.E., Ruiz-Díaz P., Guajardo-Barbosa C., Villarreal-Cabazos D., Nieto-López Nieto-López M., M., Ricque-Marie D., Locatelli L., Lemme A. 2005. Leaching impacts amino acid profiles of commercial shrimp feeds. *Feed and nutrition. Global Aquac. Advocate*. pp. 78-79.
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar M., Villarreal-Cavazos D., Beltran-Rocha J., Nieto-López M.G., Lemme A., Ricque-Marie D. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 292, 87-94.
- Cuarón J.A. 1991. Uso eficiente de los aminoácidos en la alimentación de los cerdos en México. *Memorias del Tercer Ciclo de Conferencias sobre Aminoácidos Sintéticos. FERMEX. México, D.F., México*. pp. 14-31.
- Cuarón J.A. 1993. Evaluación de la nutrición de aminoácidos en cerdos en México. *Memorias del Quinto Ciclo de Conferencias sobre Aminoácidos Sintéticos. FERMEX. México, D.F. México*. pp. 25-34.
- Cuca M., Ávila E., Pro A. 1990. Alimentación de las aves. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México, México. pp. 3-8.
- Cuzon G., Lawrence A., Gaxiola G., Rosas C., Guillaume J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235, 513-551.
- Cuzon G., Guillaume J., Gaxiola G. 2004b. Review on amino acid requirement in shrimp (Abs.). *J. Shellfish Res.*, 23, 285-286.
- Dale N. 1995. Ingredient analysis table: 1995 edition. *Feedstuffs Reference Issue*. July 19. Vol. 76 (30). p. 27.

- Davis A., Samocha T. M., Bullis R. A. 2004. Practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) working towards organics and/or all plant production diets. pp. 202-214. En: Cruz Suárez L.E., Ricque Marie D., Nieto López M.G., Villarreal Cavazos D.A., Scholtz U. y M.L. González Félix (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del Séptimo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16 al 19 de noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora. México. pp. 202-214.
- DEGUSSA. 2006. AminoDat[®] 3.0, Gold CD-Rom. USA.
- Divakaran S., Velasco M., Beyer E., Forster I., Tacon A. 2000. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. 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, Mérida, Yucatán, México. pp. 267-276.
- Divakaran S. 2006. Changes in biochemical and mineral composition in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) cultured in an outdoor raceway system. En: L.E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar, M.N. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, A.C. Puello Cruz, y A. García Ortega (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5. pp. 304-309.
- Ezquerro J. M., Garcia-Carreño F. L., Civera-Cerecedo R., Haard N. F. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157, 249-260.

- Fagbenro O.A., Davies S.J. 2001. Use of soybean flour (dehulled, solvent-extracted soybean) as a fish meal substitute in practical diets for African cat fish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): growth, feed utilization and digestibility. *J. Appl. Ichthyol.*, 17, 64-69.
- FAO. 2008. The state of the world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. p. 58.
- Fernández S.R. 1989. Valor energético de la melaza y complementación proteica en dietas para cerdos. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. p. 90.
- Fernández S.R. 1996. Aminoácidos digeribles en la formulación de dietas para el pollo de engorda. Memoria del XII Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Avicultura. AMENA. Guadalajara, Jal. México. pp. 41-52.
- Forster, I., Dominy, W., Tacon, A.G.J. 2002. The use of concentrates and other soy products in shrimp feeds. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002.* Cancún, Quintana Roo, México.
- Forster I.P., Dominy W.D. 2006. Efficacy of three methionine sources in diets for pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 37, 474-480.
- Fox J.M., Blow P., Brown J.H., Watson I. 1994. The effect of various methods on the physical a biochemical properties of shrimp head meals and their utilization by juvenile *Penaeus monodon* Fab. *Aquaculture*, 122, 209-226.

- Fox J.M., Addison L., Li-Chan E. 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture*, 131, 279-290.
- Fox J.M., Lawrence A.L., Smith F. 2004. Development of low fish meal feed formulation for commercial production of *Litopenaeus vannamei*. pp. 182-201. En: Cruz Suárez L.E., Ricque Marie D., Nieto López M.G., Villarreal Cavazos D.A., Scholtz U. González Félix M.L. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del Séptimo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16 al 19 de noviembre. Hermosillo, Sonora. México.
- Fox J.M., Davis D. A., Wilson M., Lawrence A.L. 2006. Current status of amino acid requirement research with marine penaeid shrimp. pp. 182-196. En editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León. 15 al 17 de noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Fox J.M., Davis D.A., Lawrence A.L. 2007. Methionine- sulfur containing amino acids: Limiting nutrients in comertial formulation. *Feed and Nutrition*. March/April. *Global Aquac. Advocate*. pp.74-77.
- Fox J.M., Lawrence A.L., Patnaik S., Forster I., Ju Z.Y., Dominy W. 2009. Estimation of methionine requirement of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using protein-bound and crystalline sources. Abstracts. *The International Conference and Exposition of the Society World Aquaculture 2009*. September 25-29. Veracruz, Veracruz, México. p. 310.

- Frías-Espericueta M.G., Harfush-Melendez M., Osuna-López J.I., Páez-Osuna F. 1999. Acute Toxicity of Ammonia to Juvenile Shrimp *Penaeus vannamei* Boone Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62, 646-652.
- Friedman, M. 1992. Dietary impact of food processing. Annu. Rev. Nutr., 12, 119-37
- Friman J.D. 2001. Formulation of diets on a digestible amino acids basis and factors affecting the digestibility of feedstuffs. Technical Bulletin. American Soybean Association. United Soybean Board. No. 070. AN32. Singapur, Thailand. pp. 1-9.
- Furukawa H., Tsukahara H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromium oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 32, 502-506.
- Furuya W.M., Pezzato L.E., Barros M.M., Pezzato A.C., Furuya R. B., Miranda E.C. 2004. Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquac. Res., 35, 1110-1116.
- Galicia-González A., Goytortúa-Bores E., Moyano-López F.J., Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Palacios E., Civera-Cerecedo R. 2010. Chemical Composition and Digestibility of Three Mexican Safflower Meals Used as Ingredients in Diets for Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc. En prensa.
- García-Carreño F. L., Gollas-Galván T., Navarrete del Toro M.A. 1999. Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) as source of protein hydrolysate and carotenoproteins. J. of Aquatic Food Tech., 8, 23-38.

- Gatlin III D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl A., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E.J., Stone D., Wilson R., Wurtele E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.*, 38, 551-579.
- Gaylord, T.G., Rawles, S.D., Gatlin III, D.M. 2004. Amino acid availability from animal, blended, and plant feedstuffs for hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). *Aquac. Nutr.*, 10, 345-352.
- Gómez-Jiménez S., González-Félix M.L., Perez-Velazquez M., Trujillo-Villalba D.A., Esquerra-Brauer I.R., Barraza-Guardado R. 2005. Effect of dietary protein level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* (Boone) raised in a zero water exchange culture system. *Aquac. Res.*, 36, 834-840.
- González-Félix M.L., Gómez-Jiménez S., Pérez-Velazquez M., Davis D.A., Velazco-Rameños J.G. 2007. Nitrogen budget for a low salinity, zero-water exchange culture system: I. Effect of dietary protein level on the performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac. Res.*, 38, 798-808.
- González M.J., Pesti G.M. 1994. Análisis y perspectivas de las técnicas de optimización aminoácidos en dietas para aves. Memoria del Sexto Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Aminoácidos Sintéticos. FERMEX. Septiembre. México, D.F., México. pp. 40-47.

- Goytortúa-Bores E. 1993. Evaluación del crecimiento y digestibilidad en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*), alimentado con dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*). Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., México. 112 p.
- Goytortúa-Bores E., Civera-Cerecedo R., Rocha-Meza S., Green-Yee A. 2006. Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256, 414-422.
- Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. Métailler R. 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ediciones Mundi-Prensa, México. p. 429.
- Guimarães I.G., Pezzato L.E., Barros M.M., Tachibana L. 2008. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile Tilapia. *J. World Aquac. Soc.*, 39, 6, 781-788.
- Guo R., Liu Y.J., Tian L.X., Huang J.W. 2006. Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquac. Nutr.*, 12: 83–88.
- Gutiérrez L. R. 2002. Calidad nutricional de dos productos de a base de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína o aditivo alimentario en alimentos balanceados para juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México. 102 p.

- Hernández C., Olvera-Novoa M.A., Aguilar-Vejar K., González-Rodríguez B., Abdo de la Parra I. 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 277, 244-250.
- Hunter D.A., Uglow R.F. 1993. A technique for the measurement of total ammonia in small volumes of sea water and hemolymph. *Ophelia*, 37, 31-40.
- Hu Y., Tan B., Mai K., Ai Q., Zheng S., Cheng, K. 2008. Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. *Aquac. Nutr.*, 14, 499-506.
- Huai M.Y., Tian L.X., Liu Y.J., Xu A.L., Liang G.Y., Yang H.J. 2009. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquac. Res.*, 40, 904-914.
- Huai M.Y., Liu Y.J., Tian L.H., Deng S.H., Xu A.L., Gao W., Yang H.J. 2010. Effect of dietary protein reduction with synthetic amino acids supplementation on growth performance, digestibility, and body composition of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int.*, 18, 255-269.
- Jackson C., Preston N., Thompson P.J., Burford M. 2003. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*, 218, 397-411.
- Kai H., Wang W., Jie L. 2003. Protein requirements in compounded diets for *Penaeus vannamei* juveniles. *J. of Fishery Sc. of China*, 10, 318-324.
- Kaur V.I., Saxena P.K. 2005. Incorporation of maize gluten in supplementary feed and its impact on growth and flesh quality of some carps. *Aquac. Int.*, 13, 555-573.

- Kerr B.J. 1994. Consideraciones prácticas en la utilización del concepto de la proteína ideal en pollo de engorda. Memoria del Sexto Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Aminoácidos Sintéticos. FERMEX. Septiembre. México, D.F., México. pp. 28-39.
- Kerr B.J. 1995. Métodos para reducir la excreción de nitrógeno al medio ambiente en animales monogástricos. Memoria del VII Congreso Nacional AMENA. 2 - 4 de Noviembre, Veracruz, Ver. México. pp. 85-129.
- Kitabayashi, K., H. Kurata, H. Shudo, K. Nakamura & S. Isikawa. 1971. Studies of formula feed for kuruma prawn I: on the relationship among glucosamine, phosphorus and calcium. *Bulletin of Takai Regional Fisheries Research Laboratory*, 65:91-107.
- Kureshy N., Davis A. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204, 125-143.
- Lawrence A., Lee P. 1997. Research in the Americas. pp. 567-587. En: D'Abramo L., Conklin D., Akiyama D. (Eds.) *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. Vol. 6.
- Lazo J.P., Romaine R., Reigh R. 1998. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 29, 441-450.
- Leclercq B. 1998. El concepto de proteína ideal y el uso de aminoácidos sintéticos: Estudio comparativo entre aves y cerdos. XIV Curso de Especialización FEDNA. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. España. Fundación España para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Eds: P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Fira de Barcelona, España.

- Lemos D., Lawrence A.L., Siccardi A.J. 2009. Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 295, 89-98.
- Li E., Chen L., Zeng C., Chen X., Yu N., Lai Q., Qin J.G. 2007. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*, 265, 385-390.
- Lim C., Dominy W. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 87, 53 - 63.
- Lim C. 1993. Effect of dietary pH on amino acid utilization by shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 114, 293-303.
- Lim C., Beames R.M., Eales J.G., Prendergast A.F., McCLeese J.M., Shearer K.D., Higgs D.A. 1997. Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquac. Nutr.* 3, 269-279.
- Lin H.Z., Li Z.J., Chen Y.Q., Zheng W.H., Yang K. 2006. Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture*, 253, 495-501.
- Liou Ch.H., Lina S.C., Cheng J.H. 2005. Urinary amino acid excretion by marine shrimp, *Penaeus monodon*, in response to orally administrated intact protein and crystalline amino acids. *Aquaculture*, 248, 35- 40.

- López-Alvarado J., Langdon C.J., Teshima S., Kanazawa A. 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture*, 122, 335–346.
- Low A.G. 1980. Nutrient absorption in pigs. *J. Sci. Food. Agric.* 31, 1087-1130.
- Lubis A.D., Kumagai H. 2007. Comparative study on yield and chemical composition of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* Moench) using different levels of manure application. *Anim. Sc. J.* 78, 605–612.
- Mariscal G., Ávila E., Tejada I., Cuarón J., Vásquez C. 1998. Contenido de aminoácidos totales y digeribles verdaderos para cerdos. 1ª ed. Querétaro, México. CNIFyMA, INIFAP.
- Mariscal-Landín G., Avellaneda J.H., Reis de Souza T.C., Aguilera A., Borbolla G.A., Mar B. 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 117, 245–264.
- Martin G.G., Simcox R., Nguyen A., Chilingaryan A. 2006. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, formation, and permeability. *Biol. Bull.*, 211, 275-285.
- Martínez-Córdova L.R., Campaña-Torres A., Porchas-Cornejo M.A. 2002. The effects of variation in feed protein level on the culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) in low-water exchange experimental ponds. *Aquac. Res.*, 33:995-998.

- McIntosh D., Samocha T.M., Jones E.R., Lawrence A.L., McKee D.A., Horowitz S., Horowitz A. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21, 215-227.
- McIntosh D., Samocha T.M., Jones E.R., Lawrence A.L., Horowitz S., Horowitz A. 2001. Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 31%) on water and sediment quality, and on the production of *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. *Aquacultural Engineering*, 25, 69-82.
- McKevith B. 2004. Nutritional aspects of cereals. British Nutrition Foundation, London, United Kingdom. *Nutrition Bulletin* 29, 111-142.
- Mente E., Coutteau P., Houlihan D., Davidson J., Sorgeloos P. 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J. Exp. Biol.*, 205, 3107-3122.
- Merino-Carranza B., Gómez-Rosales S., Cuarón-Ibargüengoytia J.A. 2005. Requerimientos de lisina digerible de cerdos de 14 a 50 kg de peso corporal sujetos a diferentes condiciones de manejo y alojamiento. *Téc. Pecu. Méx.* 43, 139-153.
- Millamena O.M., Teruel M.B., Kanazawa A., Teshima S. 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 143, 403-410.
- Millamena O.M., Bautista M.N., Reyes O.S., Kanazawa A. 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 151, 9-14.
- Millamena O.M., Bautista M.N., Reyes O.S., Kanazawa A. 1998. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. *Aquaculture*, 164, 95-104.

- Millamena O.M., Teruel M.B., Kanazawa A., Teshima S. 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture*, 179 (1-4):169-179.
- Miller E.L., Huang Y.X., Kasinathan S., Rayner B., Luzzana U., Moretti V.M., Valfr F., Torrissen K.R., Jensen H.B., Opstvedt J. 2001. Heat-damaged protein has reduced ileal true digestibility of cystine and aspartic acid in chicks. *J. of Animal Sci.* 79, Suppl 1, 65.
- Miller E.L. 2002. Protein nutrition requirements of farmed livestock and dietary supply. Protein sources for the animal feed industry. FAO, Animal Production and Health Proceedings No. 1. Expert Consultation and Workshop. Bangkok. 29 April-3 May. pp. 29-75.
- Mitchell H.H. 1964. Comparative nutrition of man and domestic animals. Academic Press, New York, NY, U.S.A.
- Molina C. 2004. Evaluación del gluten de maíz como fuente reemplazante de la harina de pescado en dietas para el camarón juvenil *Litopenaeus vannamei*. CENAIM INFORMA, Boletín Interactivo No. 106.
- Molina-Poveda C., Morales M.E. 2004. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone) *Aquac. Res.*, 35, 1158-1165.
- Montoya R.A., Lawrence A.L., Grant W.E., Velasco M. 2002. Simulation of inorganic nitrogen dynamics and shrimp survival in an intensive shrimp culture system. *Aquac. Res.*, 33, 81-94.

- Moore S., Stein W.H. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In: Methods in Enzymology, S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds). New York: Academic Press, U.S.A. pp. 819-824.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 1988. III. Metabolismo de proteínas y aminoácidos: Biosíntesis de Aminoácidos. En Bioquímica de Harper. 11th ed. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., México. p. 262.
- Mu Y.Y., Lam T.J., Guo J.J., Shim K.F. 2000. Protein digestibility and amino acid availability of several protein sources for juvenile Chinese hairy crab *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards (Decapoda, Grapsidae). Aquac. Res., 31, 757-765.
- Naegel L. C. A., Rodríguez-Astudillo S. 2004. Comparison of growth and survival of white shrimp postlarvae (*Litopenaeus vannamei*) fed dried *Artemia* biomass versus four commercial feeds and three crustacean meals. Aquac. Int., 12, 573–581.
- National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press. Washington, DC. USA. 114 p.
- National Research Council (NRC). 1994. Nutrient Requirements of Poultry. Ninth Ed. National Academy Press, Washington, DC, USA, 155 pp.
- National Research Council (NRC). 1998. Nutrient Requirements of Swine. Tenth Ed. National Research Council. National Academy Press, Washington, DC, USA, 189 pp.
- New M.B., Wijkstom U.N. 2002. Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds: Further Thoughts on the Fishmeal Trap. FAO Fisheries Circular No. 975 FIPP/C975. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Nutrition^{MR}. 2008. Software. Guadalajara, Jalisco, México.

- Obaldo L.G., Tacon A.G. 2001. Manufacturing different diet sizes and its effect on pellet water stability and growth of three size classes of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. of Applied Aquac.*, 11, 57 - 66.
- Obaldo L.G., Divakaran S., Tacon A.G. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. *Aquac. Res.* 33, 369-367.
- Ott L.R. 1992. Analyzing data: analysis of variance methods. En: Ott R.L. y Longnecker M.T. (Eds.). *An introduction to statistical methods and data analysis*. 4th Edición. Doxbury Press, Belmont, CA, EUA.
- Paripatananont T., Boonyaratpalin M., Pengseng P., Chotipuntu P. 2001. Substitution of soy protein concentrate for fishmeal in diets of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquac. Res.*, 32, 369 – 374.
- Parsons C.M. 1991. Amino acid digestibilities for poultry: feedstuff evaluation and requirements. *FERMEX Technical review-1*. pp. 1-15. Nutri-Quest, Inc. Chesterfield, MO, U.S.A.
- Pascual C., Sánchez A., Rosas C. 2003. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad del Carmen, Campeche. México.
- Pascual C., Sánchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gaxiola G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E., Rosas C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251, 416 - 429.

- Pearce C., Dagget T., Robinson S. 2002. Effect of binder type and concentration on prepared feed stability and gonad yield and quality of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 205, 301-323.
- Pérez-Velázquez M., González-Félix M.L., Jaimes-Bustamente F., Martínez-Córdova L.R., Trujillo-Villalba D.A. 2007. Investigation of the effects of salinity and dietary protein level on growth and survival of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 38, 475-485.
- Pérez-Velázquez M., González-Félix M. L., Gómez-Jiménez S., Davis D. A., Miramontes-Higuera N. 2008. Nitrogen budget for a low-salinity, zero-water exchange culture system: II. Evaluation of isonitrogenous feeding of various dietary protein levels to *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac. Res.*, 39, 995-1004.
- Primavera J.H. 1997. Socio-economic impacts of shrimp aquaculture. *Aquac. Res.*, 28, 815-827.
- Primavera J.H. 2005. Mangroves, fishponds, and the quest for sustainability. *Science*. 7 October, Vol. 310, 57-59.
- Rawles S.D, Gatlin III D.M. 2000. Nutrient digestibility of common feedstuffs in extruded diets for sunshine bass *Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂. *J. World Aquac. Soc.* 31, 474-480.
- Rivas-Vega M.E., Goytortúa-Bores E., Ezquerra-Brauer J.M., Salazar-García M.G., Cruz-Suárez L.E., Nolasco H., Civera-Cerecedo R. 2006. Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *J. of Food Chem.*, 97, 41-49.

- Rivas-Vega M.E., Rouzaud-Sandez O., Salazar-Garcia M.G., Ezquerro-Brauer J.M., Goytortua-Bores. E., Civera-Cerecedo. R. 2009. Physicochemical properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) meals and their apparent digestibility in white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Hidrobiológica*, 19, 15-23.
- Robbins K.R., Norton H.W., Baker D.H. 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. Nutr.*, 109, 1710-1714.
- Rosas C., Cuzon G., Taboada G., Pascual C., Gaxiola G., Van Wormhoudt A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquac. Res.*, 32, 531-547.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Pascual C., Taboada G., Arena L., Van Wormhoudt A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 268, 47-67.
- Rosas C. A., Sánchez M.E., Chimal A., Brito R. 2003. Manual de Métodos para la Evaluación del Balance Energético en Crustáceos. Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental Fac. de Ciencias, UNAM. Jornadas Iberoamericanas de Nutrición en Acuicultura. Avances de la Nutrición de Camarones Peneidos: Hacia la optimización de alimentos y estrategias de alimentación para una camaronicultura sustentable. Centro de Formación de la Cooperación Española en Cartagena de Indias, Colombia, 7 a 11 de julio.

- Ross R. D., Cromwell G. L., Stahly T. S. 1984. Effects of source and particle size on the biological availability of calcium in calcium supplements for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 59, 125-134.
- Samocha T.M., Davis D.A., Saoud I.P., DeBaulk K. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean, poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 231, 197-203.
- SAS. 1994. Institute. Procedures Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shiau S.Y. 1998. Nutrient requirement of penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164, 77-93.
- Sibbald I.R. 1987. Estimation of available amino acids in feedingstuffs for poultry and pigs: a review with emphasis on balance experiments. *Can. J. Anim. Sci.* 67, 221-300.
- Siccardi III A.J., Lawrence A.L., Glatin III D.M., Fox J.M., Castille D., Pérez Velazquez M., González Félix M.L. 2006. Requerimientos de proteína y energía digerible de sub adultos de *Litopenaeus vannamei*. pp. 238-281. En editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. 15 al 17 de noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.*
- Smith L.L., Lee P.G. Lawrence A.L. 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boon, effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture*, 46, 85-96.

- Smith D.M., Allan G.L., Williams K.C., Barlow C. 2000. Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia. 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. Mérida, Yucatán, México. pp. 277-286.
- Smith D.M., Tabrett S.J., Barclay M.C., Irvin S.J. 2005. The efficacy of ingredients included shrimp feeds to stimulate intake. *Aquac. Nutr.*, 11, 263-272.
- Smith D.M., Williams K.C., Irvin S.J. 2005b. Response of the tropical spiny lobster *Panulirus ornatus* to protein content of pelleted feed and to a diet of mussel flesh. *Aquac. Nutr.* 11, 209–217.
- Sokal R.R. 1995. Assumption of analysis of variance. En: Sokal R.R. and Rohlf F.J. (Eds.). *Biometry: Principles and practice of statistic in biological research*. 3rd Edition. W.H. Freeman and Company, New York, USA. pp. 392-450.
- Southern L.L. 1991. Digerible amino acids and digerible amino acid requirements for swine. FERMEX Technical review-2. Pp.1-16. Nutri-Quest, Inc. Chesterfield, MO, U.S.A.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. 1996. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Segunda edición. Mc Graw-Hill. México, D.F. 622 pp.
- Sudaryono A., Hoxey M.J., Kailis S.G., Evans L.H.1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 134, 313-323.

- Sudaryono A., Tsvetnenko E., Evans L.H. 1999. Replacement of soybean meal by lupin meal in practical diets for juvenile *Penaeus monodon*. J. World Aquac. Soc. 30, 46-57.
- Tacon A.G.J. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Proyecto AQUILA II. Documento de Campo No. 4, GCP/RLA/102/ITA. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia, 572 pp.
- Tacon A.G.J., Akiyama D. 1997. Feed Ingredients. In Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Volume 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. pp. 411-472.
- Tacon A.G.J. 2002. Thematic review of feeds and feed management practices in shrimp aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. pp 26.
- Tacon A.G.J., Cody J.J., Conquest L.D., Divakaran S., Forster I.P., Decamp O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquac. Nutr., 8, 121-137.
- Tacon A.G.J., Forster I.P. 2003. Aquafeeds and the environment: policy implications. Aquaculture, 226, 181-189.
- Teicher-Coddington D.R., Martínez D., Ramírez E. 2000. Partial nutrient budgets for semi-intensive shrimp farms in Honduras. Aquaculture, 190, 139-145.
- Terrazas F. M.M., Ávila G.E., Cuca G. M., Nolasco S. H. 2005. Efecto de la incorporación de harina de pescado con distinto grado de cocción a dietas para pollos de engorda formuladas a un perfil de aminoácidos digeribles. Téc. Pecu. Mex., 43, 297-308.

- Thompson K.R., Raíles S.D., Metts L.S., Smith R., Winsatt A., Gannam A.L., Twibell R.G., Jonson R.B., Brady Y.J., Websteri C.D., 2008. Digestibility of dry matter, protein, lipid, and organic matter of two fish meals, two poultry by-product meals, soybean meal, and distiller's dried grains with solubles in practical diets for Sunshine Bass, *Morone chrysops* 3 *M. saxatilis*. J. World Aquac. Soc., 39, 352-363.
- Tibbetts S.M., Santosh P. L., Milley J.E. 2004. Apparent digestibility of common feed ingredients by juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. Aquac. Res., 35, 643-651.
- Vázquez-Añón M., Giesen A.F. 2004. Use of methionine hydroxy analogue in aquaculture feeds. pp 1-9 En: Cruz Suárez L.E., Ricque Marie D., Nieto López M.G., Villarreal Cavazos D.A., Scholtz U. y González Félix M.L.(Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del Séptimo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16 al 19 de noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora. México.
- Velasco M., Lawrence A.L., Castille F.L., Obaldo L.G. 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. 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.
- Venero J.A., Davis A.D., Rouse D.B. 2007. Variable feed allowance with constant protein input for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under semi-intensive conditions in tanks and ponds. Aquaculture, 269, 490-503.

- Villarreal H., Civera-Cerecedo R., Hernández-Llamas A. 2006. Effect of partial and total replacement of fish, shrimp head, and soybean meals with red crab meal *Pleuroncodes planipes* (Stimpson) on growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac. Res.*, 37, 293-298.
- Wathelet B. 1999. Nutritional analysis for proteins and amino acids in beans (*Phaseolus sp.*). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 3, 197-200.
- Wilson R.P. 2002. Amino acids and protein. In: *Fish Nutrition*, 3rd. edn. Ed. by J.E. Halver & R.W. Hardy. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp. 143-179.
- Wilson R.P. 2003. Amino Acid Requirements of Finfish and Crustaceans. In: J.P.F. D'Mello. *Amino Acids in Animal Nutrition*, 2nd Edition. CAB International Publishing. Wallingford, Oxon, UK. pp. 427-448.
- Wu G., Davis P.K., Flynn N.E., Knabe D.A., Davidson J.T. 1997. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. *J. Nutr.*, 127, 2342 -2349.
- Yaemsooksawat N., Jintataporn O., Areechon N., Puntuma-o-pas S., Thongtuak C. 2009. Effect of dietary protein level on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 31, 1, 15-20.
- Yanar Y., Celic M. 2006. Seasonal amino acid profiles and mineral contents of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) and speckledshrimp (*Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, 94, 33-36.

- Yang Q., Zhou X., Zhou Q., Tan B., Chi S., Dong X. 2009. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquac. Res.*, 40, 1-9.
- Yu Y. 2004. Replacement of fishmeal with poultry byproducts meal and meat and bone meal in shrimp, tilapia and trout diets. pp. 238-258. En: Cruz Suárez L.E., Ricque Marie D., Nieto López M.G., Villarreal Cavazos D.A., Scholtz U. y M.L. González Félix (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del Séptimo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16 al 19 de noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora. México.
- Yu Y. 2006. Use of poultry by-product meal, and meat and bone meal. In *Asian Aquafeeds: Current developments in the aquaculture feed industry*. W.K. Ng and C.K. Ng (editors). Malaysian Fisheries Society Occasional Publication No. 13, Kuala Lumpur, Malaysia. p. 224.
- Yu Y. 2006a. Rendered products in shrimp aquaculture feeds, in: Meeker, D. ed. *Essential Rendering*. National Renderers Association, Kirby Lithographic Company, Arlington, VA, USA. pp. 195-211.

ANEXOS

Anexo I. Claves de alimentos para ingredientes de origen marino.

Tabla XXI. Claves del laboratorio de Nutrición Acuícola usadas en los ingredientes de origen marino evaluados en la prueba de digestibilidad.

Ingredientes	Clave del laboratorio
Harina de sardina entera Monterrey ¹	HP0508-2
Harina de sardina entera Monterrey ²	HPES-1-0602
Harina de sardina entera Monterrey ³	HPES-2-0602
Harina de residuos del fileteado de atún ⁴	HATÚN0602
Harinas misceláneas:	
Harina de desechos de almeja catarina ⁵	HDAC0602
Concentrado proteico de solubles de pescado ⁶	CPSP0506
Harina de langostilla ⁷	HL9804
Harina de cabeza de camarón ⁸	HCAM0602
Harina de calamar ⁸	HCAL0506

¹Lote 2005 (Conserva San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). ²Lote 2006 (Productos de Ensenada B.C., México). ³Lote 2006 (Conserva San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México). ⁴Lote 2006 (Marín Industrias, Manzanillo, Colima. México). ⁵*Argopecten ventricosus* (preparada en el CIBNOR según Goytortúa-Bores et al. (2006). ⁶SOPROPECHE, Boulogne, Francia. ⁷*Pleuroncodes planipes* (preparada en el CIBNOR según Goytortúa-Bores et al. (2006). ⁸*Litopenaeus vannamei* (Proteínas Marinas y Agropecuarias. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México). ⁹*Loligo gahi*, Chile Exportadora, Santiago, Chile).

Anexo II. Claves de alimentos para ingredientes de origen terrestre.

Tabla XXII. Claves del laboratorio de Nutrición Acuícola usadas en los ingredientes de origen terrestre evaluados en la prueba de digestibilidad

Ingredientes¹	Clave del laboratorio
De origen animal:	
Caseína ²	SIGMA C3400
Harina de ave ³ (subproductos de rastro de pollo y pavo)	HAVE0602
Harina de cerdo ⁴ (subproductos de rastro)	HCER0508-1
De origen vegetal:	
Harina de trigo ⁶	HIT0508
Harina de sorgo ⁷	HSOR0601
Pasta de soya ⁵	PSOY0507-1
Gluten de maíz ⁸	GLUMA0602
Gluten de trigo ⁹	GT0509

¹Tamizados a 250 μ , excepto harina de cerdo (500 μ m). ²SIGMA C-3400. ³Harina de subproductos de pollo y pavo (Ind. Griffind. Jackson, MI, EUA). ⁴CONAGRA, Iowa, EUA. ⁵Harinera Parayas, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. ⁶Valle de Santo Domingo, B.C.S., México. ⁷AGYDSA. Guadalajara, Jalisco, México. ⁸EURONUTEC, Querétaro, Qro., México. ⁹PROBST S.A. de C.V., Tlalnepantla, Edo. de México, México.

Anexo III. Resultados del análisis de agua de los acuarios durante el bioensayo de crecimiento (experimento 2).

Tabla XXIII Concentración de nitratos, nitritos y amonio del agua durante el bioensayo de crecimiento.

PD ¹ (%)	Met ¹ (%)	Nitritos mg/L			Nitratos mg/L			Amonio mg/L		
		Min	Max	Prom	Min	Max	Prom	Min	Max	Prom
18.0	0.25	0.010	0.018	0.015	0.006	0.310	0.108	0.009	0.387	0.147
	0.40	0.006	0.019	0.012	0.006	0.297	0.103	0.009	0.069	0.049
	0.55	0.016	0.018	0.017	0.006	0.593	0.202	0.090	0.895	0.347
	0.70	0.011	0.017	0.015	0.006	0.824	0.287	0.009	0.140	0.062
	0.85	0.011	0.019	0.015	0.006	0.719	0.226	0.009	0.516	0.187
23.0	0.35	0.022	0.041	0.031	0.006	0.134	0.049	0.009	0.291	0.122
	0.50	0.023	0.034	0.027	0.036	0.689	0.282	0.009	0.090	0.055
	0.65	0.023	0.024	0.023	0.006	0.006	0.006	0.009	0.065	0.027
	0.80	0.022	0.037	0.030	0.006	0.329	0.114	0.009	0.153	0.083
	0.95	0.023	0.048	0.035	0.037	0.215	0.138	0.009	0.356	0.178
28.0	0.45	0.029	0.048	0.040	0.009	0.141	0.052	0.009	0.216	0.100
	0.60	0.034	0.071	0.047	0.006	0.313	0.210	0.070	0.400	0.230
	0.75	0.037	0.057	0.047	0.006	0.115	0.071	0.159	0.614	0.413
	0.90	0.034	0.078	0.045	0.006	0.379	0.176	0.150	0.461	0.259
	1.05	0.023	0.048	0.038	0.006	0.418	0.227	0.180	0.614	0.330
33.0	0.55	0.052	0.112	0.074	0.049	0.468	0.238	0.348	0.772	0.501
	0.70	0.083	0.153	0.124	0.199	0.215	0.209	0.412	0.938	0.738
	0.85	0.066	0.111	0.082	0.114	0.264	0.211	0.387	0.625	0.491
	1.00	0.060	0.168	0.104	0.033	0.703	0.435	0.416	0.896	0.677
	1.15	0.044	0.100	0.074	0.006	0.173	0.117	0.500	1.022	0.674

Valores correspondientes a una muestra por tratamiento tomada de 20 acuarios con un número similar de organismos a los 15, 30 y 43 días de iniciado el bioensayo. Min = mínimo, Max = máximo, Prom = Promedio. PD = % de proteína digerible calculada+% Met (Metionina total calculada).

Anexo IV. Productos de investigación.

Artículos en revistas indexadas

- Martín Terrazas, Roberto Civera, Lilia Ibarra & Ernesto Goytortúa. 2010. Coeficientes de utilización digestiva aparente de materia seca, proteína y aminoácidos esenciales de ingredientes de origen terrestre para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Revista de Biología Tropical 58-4 (Diciembre, 2010) en prensa.
- Martín Terrazas-Fierro, Roberto Civera-Cerecedo, Lilia Ibarra-Martínez, Ernesto Goytortúa-Bores, Margarita Herrera-Andrade and Armando Reyes-Becerra. Apparent dry matter, protein, and essential amino acids digestibility of marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Revista Aquaculture, en prensa.

Presentaciones en congresos internacionales

- Martín Terrazas-Fierro, Margarita Herrera-Andrade, Armando Reyes-Becerra, Ernesto Goytortúa-Bores, Lilia Ibarra-Martínez and Roberto Civera-Cerecedo. 2008. Apparent protein and essential amino acid digestibility of different feedstuffs consumed by juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Poster. XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Florianopolis, Brasil. Junio 1 al 5 de 2008.
- Martín Terrazas-Fierro, Ernesto Goytortúa-Bores and Roberto Civera-Cerecedo. 2009. Optimum levels of digestible protein and total methionine in diets for whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*". Ponencia oral. Congreso World Aquaculture 2009. Septiembre 25 al 29 de 2009. Veracruz, México.