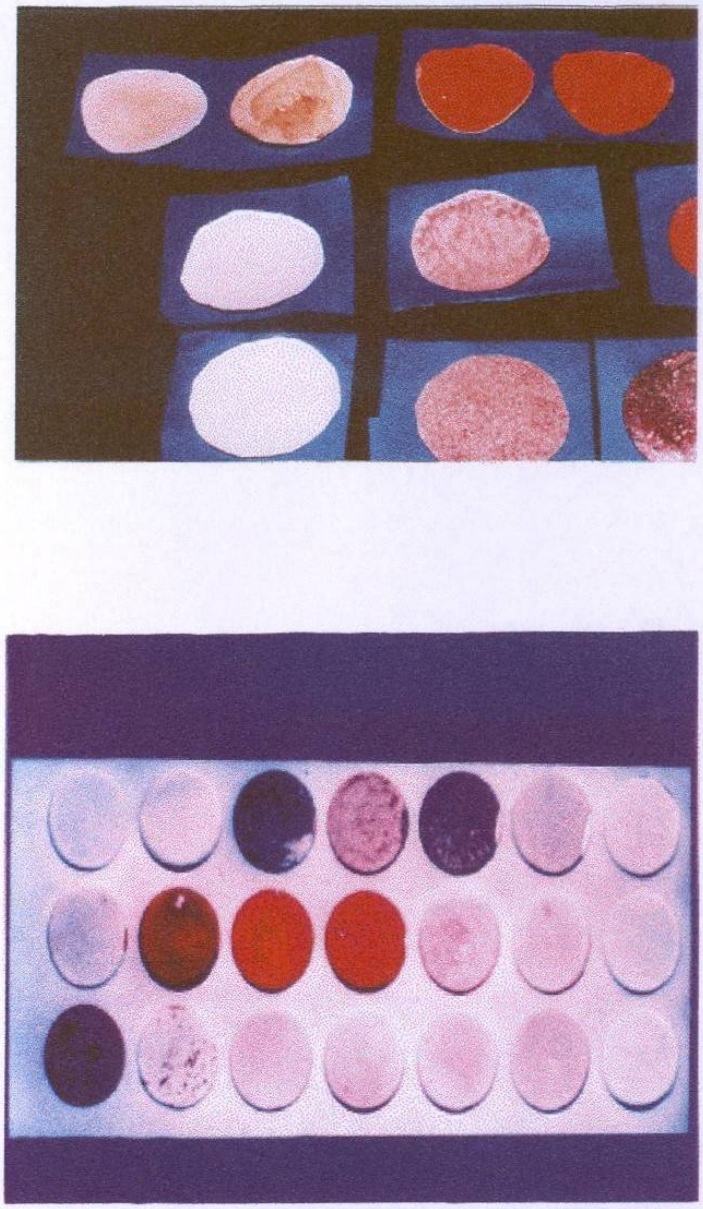


Figura 19.- Pigmentación obtenida en los tratamientos del 9 al 16.

en un liofilizador de charolas, se resuspendió y filtró para su cuantificación de la intensidad de color, la cual dio una concentración de 2800ppm y solo el 10% fue astaxantina (se cuantificó por cromatografía de capa fina de alta resolución; conocido por sus siglas en inglés HPTLC).

La producción de biomasa a las 15 h fue de 6.551 a 7.835 g/l y con un consumo de etanol de 5.22 a 7.62 y un rango entre las 20 a las 100 h de 1.82 a 2.913 g/l y de 1 a 2 g/l respectivamente (fig. 20).

Producción de biomasa, consumo de etanol, color y concentración de pigmentos

Tratamiento	Biomasa g/l*	Etanol g/l*	Color observado	Biomasa g/l**	Carotenos ppm
1	6.551	5.32	crema - crema	2.032	100
2	7.03	5.7	crema - verde	2.178	100
3	6.958	5.32	crema - "rojo"	2.034	"2800"
4	7.013	7.62	crema - rosa	2.913	100
5	6.716	5.27	crema - verde	2.016	100
6	7.835	4.76	crema - verde	1.82	100
7	7.11	6.65	crema - amarillo	2.544	100
8	7.428	5.22	crema - crema	1.994	100

* a las 15 h gramos de etanol consumido

** promedio de 20 a las 100 h, consumo de etanol 0.2%

" " pigmentos adheridos a la pared del reactor en la parte superior

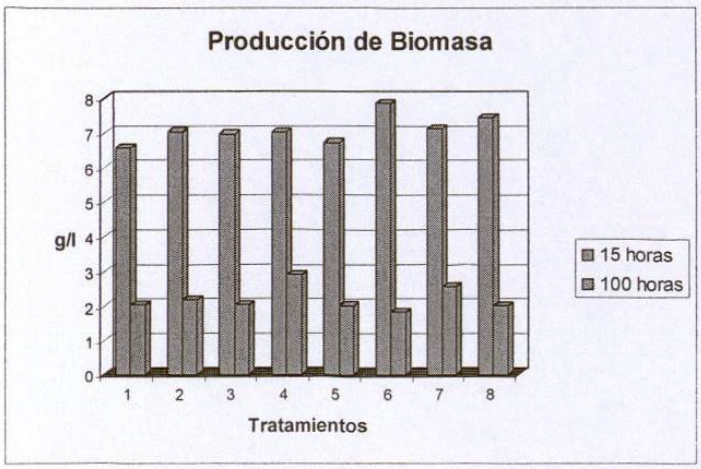


Figura 20.- Producción de Biomasa en los tratamientos del 1 al 8.

Para la segunda plantilla 9, 10, 11 y 13. El tratamiento número nueve, fue el único que presentó coloración rosa en todo el reactor; mientras que el 11 presentó un color naranja, para el 10 y 13, solo a nivel del micelio adherido en la parte superior del reactor; de color rosa y morado respectivamente. Así mismo, se observó que la concentración de biomasa (su peso en seco) es inversamente proporcional a la producción de pigmento. La producción de biomasa a las 22 h osciló de 2.031 a 4.987 g/l y con un consumo de etanol de 5.958 a 6.835 y entre las 20 a las 100 h una biomasa de 1.19 a 1.994 g/l y un consumo de etanol de 1 a 2 g/l (fig. 21).

Producción de biomasa, consumo de etanol, color y concentración de pigmentos

Tratamiento	Biomasa g/l*	Etanol g/l*	Color observado	Biomasa g/l**	Carotenos ppm
9	3.678	6.051	crema - rosa	1.19	2800
10	4.463	6.03	crema -"rosa"	1.38	"2800"
11	4.162	5.958	crema - naranja	1.09	1800
12	4.58	6.013	crema - crema	1.21	100
13	4.987	6.116	crema -"morado"	1.22	"8000"
14	2.031	6.835	crema - crema	1.23	100
15	3.795	6.13	crema - crema	1.26	100
16	4.633	6.275	crema - crema	1.994	100

* a las 22 h gramos de etanol consumido

** promedio de 20 a las 100 h, consumo de etanol 0.2%

"-" pigmentos adheridos a la pared del reactor en la parte superior

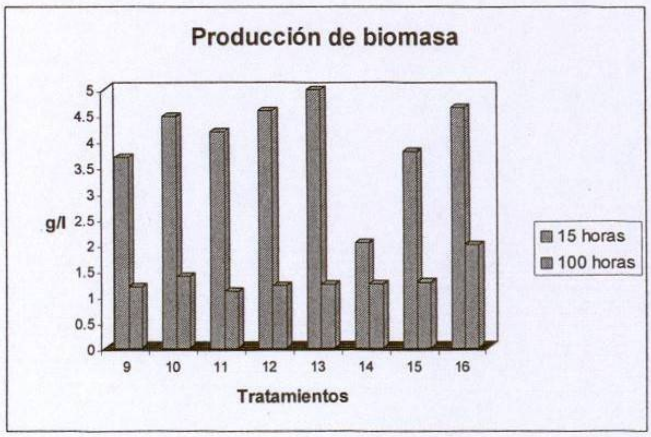


Figura 21.- Producción de Biomasa en los tratamientos del 9 al 16.

4.2.3 Evaluación de la cinética del cultivo continuo

Los valores de μ, fueron obtenidos de la fase de crecimiento exponencial. A las 15 o 16 h estos valores cambiaron a *D*, debido a la introducción de medio de cultivo fresco y su salida correspondiente.

En la tabla siguiente se muestran los rendimientos YX/S, YP/S y Y P/X correspondientes a la primera plantilla, donde P representa los pigmentos totales, de los cuales solo un 10% corresponde a la xantófila llamada astaxantina. Además los valores de la velocidad de crecimiento y tiempos de duplicación (figs. 22 y 23).

Evaluación de la cinética del cultivo continuo

Tratamiento	μ(hr^{-1})	td(hr)	YX/S*	YP/S**	Y P/X**
1	0.0859	8.00	1.016	0.05	0.0492
2	0.0962	7.20	1.089	0.05	0.0459
3	0.1431	5.24	1.017	0.14	0.1376
4	0.1671	4.15	1.456	0.05	0.0343
5	0.1088	6.36	1.008	0.05	0.0496
6	0.0920	7.53	0.910	0.05	0.0549
7	0.1765	4.32	1.272	0.05	0.0393
8	0.1079	6.42	0.997	0.05	0.0501

* 15 hr / ** 100 hr

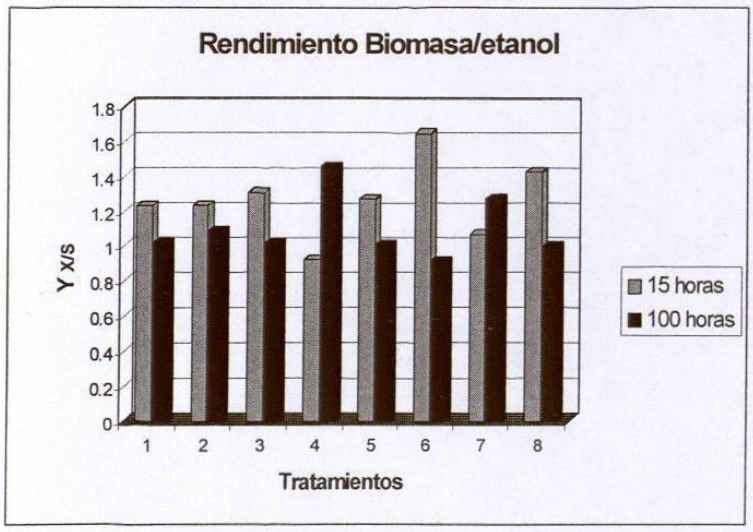


Figura 22.- Rendimiento de Biomasa-sustrato de los tratamientos del 1 al 8.

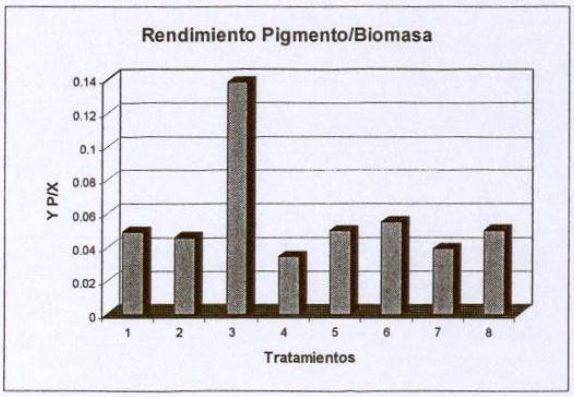


Figura 23.- Rendimiento del Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 1 al 8.

Los tiempos de duplicación de los microorganismos oscilaron entre las 4.5 y las 8 h; la fuente de carbono inicial utilizada por los microorganismos, fueron los azúcares presentes en el medio de cultivo, ya que la concentración de etanol inicial registrada fue de 8g/l, permaneciendo sin cambios durante este mismo lapso; posteriormente (15 h) se registraron en promedio 2g/l.

En la tabla siguiente se muestran las velocidades de crecimiento, tiempos de duplicación y los rendimientos YX/S, YP/S y Y P/X de los tratamientos del 9 al 16. El tratamiento número nueve con un rendimiento de 0.2352 se le denominó hongo productor de pigmento rosa numero dos (HPPR2).

Evaluación de la cinética del cultivo continuo

Tratamiento	$\mu(hr^{-1})$	td(hr)	YX/S*	YP/S**	Y P/X**
9	0.0978	7.00	0.595	0.14	0.2352
10	0.0899	8.00	0.690	0.14	0.2028
11	0.0698	10.00	0.545	0.09	0.1651
12	0.1012	7.00	0.605	0.05	0.0826
13	0.1520	4.56	0.610	0.40	0.6557
14	0.0696	10.00	0.615	0.05	0.0813
15	0.0978	7.00	0.630	0.05	0.0793
16	0.1191	6.00	0.997	0.05	0.0501

* 15 hr / **100 hr

En el tratamiento número nueve se analizaron los pigmentos por cromatografía líquida de alta resolución y se identificaron la zeaxantina, la *trans* luteína y el β-caroteno. La astaxantina no se detectó. Sin embargo, también se observaron otros carotenos no identificados (figs. 24 y 25).

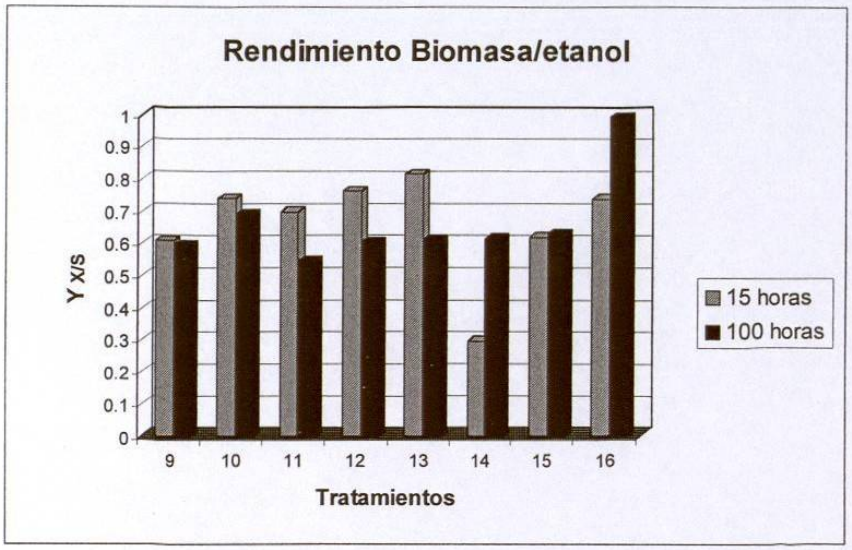


Figura 24.- Rendimiento de Biomasa-sustrato de los tratamientos del 9 al 16.

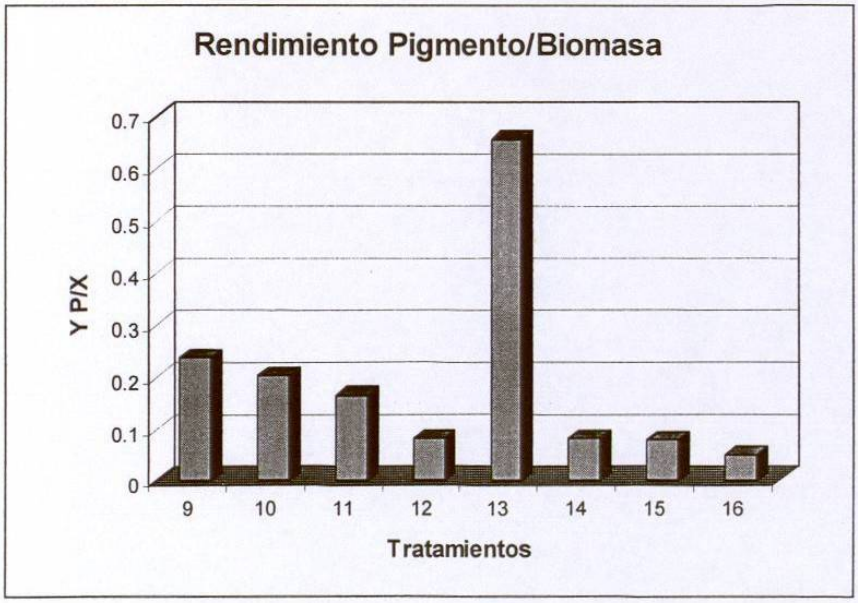


Figura 25.- Rendimiento de Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 9 al 16.

A partir del tratamiento que pigmentó el número tres de la primera plantilla, se planteó la segunda plantilla. Los datos se obtuvieron de las diferencias promedio entre los "peores" y los "mejores". Los resultados se analizaron por separado, la producción de biomasa y pigmento. También se combinaron las dos respuestas y al producto se le sacó raíz cuadrada. Posteriormente los datos fueron ordenados en una columna de menor a mayor, enseguida se tomo el primer valor como el "peor" promedio y se saca la diferencia del promedio de la suma de los 7 datos restantes (1:6); después se toma como promedio "peor" los tres primeros datos contra los cuatro últimos (3:5), (5:3), (7:1), (2:4), (4:4), (6:2), de estos resultados se obtuvieron los coeficientes de deseabilidad sacandole raíz a la n (n = número de respuestas) y se comparon con los rendimientos obtenidos de las sumas horizontales de la tabla de datos distribuidos según la plantilla de Plackett-Burman (Hendrix, 1980).

Para la segunda plantilla el tratamiento 13 fue el que presentó mayor pigmentación y el análisis de los datos por el paquete "Design easy analysis"indicaron las variables óptimas de trabajo que favorecerán la pigmentación son: la temperatura de 25°C , el de pH 4.5, un volumen de aire por lto de medio de cultivo (VVM), 2 propelas , una tasa de alimentación de 400 ml/h, la agitación de 400rpm y la presencia del líquido de remojo (LRM).

4.2.4 Coeficiente de transferencia y demanda biológica de oxígeno

De los tratamientos que presentaron pigmentación: nueve, diez, 11 y 13, se determinó por duplicado su *Na* y *Kla*.

Resultados de la Na y Kla

Tratamiento	*Na* mg/l.hr	*Kla* $l.hr^{-1}$
9	1208	302
	1271	318
10	1023	256
	1101	275
11	1185	296
	1300	325
13	1023	256
	1141	285

4.2.5 Asociación simbiótica

A continuación se muestra la cinética de crecimiento de cada uno de los microorganismos del cultivo mixto. En la curva de levadura, están presentes dos: el ascomiceto *Saccharomyces exiguus* y el basidiomiceto *Phaffia rhodozyma;* el hongo corresponde al género *Penicillum* y la bacteria al género *Pseudomonas* (fig. 26).

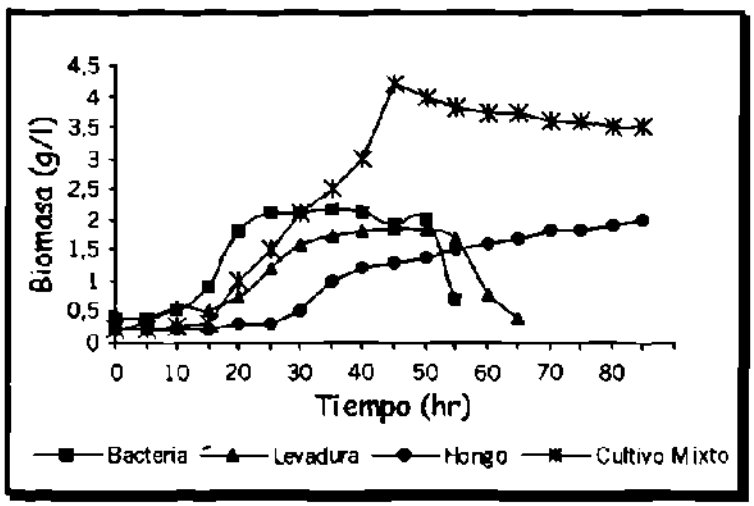


Figura 26.- Cinéticas individuales de cada uno de los microorganismos y del cultivo mixto.

Los resultados de la figura anterior muestran que hay un efecto benéfico entre los individuos que componen el cultivo mixto. La velocidad específica de crecimiento para la *Pseudomonas* sp., es de 0.112 h-1; para la *Penicillum* sp., 0.022 h-1; para la *Phaffia* y la *S. exiguus* de 0.0758 h-1.

A pesar de que las velocidades de crecimiento de cada microorganismo son muy diferentes, existe una asociación entre ellos que permite, cuando se encuentran en comunidad, aumentar su velocidad específica de crecimiento a 0.1194. Esto es muy importante, debido a que este cultivo mixto produce aproximadamente tres veces más pigmento que el que se obtendría con cada uno de los microorganismos por separado. Lo anterior nos permite visualizar que la asociación entre los miembros de este cultivo positiva y/o benéfica, y puede ser mutualista, en la cual todas las especies resultan beneficiadas con esa asociación, o comensalista, en la cual alguna o algunas de las especies se benefician y las otras simplemente no se ven afectadas.

4.3 *Caracterización bioquímica de la biomasa pigmentada HPPR1 y HPPR2*

4.3.1 *Análisis proximal de la biomasa*

Los resultados del análisis proximal de las biomasas de HPPR1B, HPPR2 y *Phaffia rhodozyma* producto comercial de la empresa Merck, se muestran en la siguiente tabla. Se obtuvo como dato importante que la *Phaffia* comercial muestra de un 25% a un 30% menos de proteína que las biomasas HPPR1B y HPPR2 (fig. 27).

Parámetros	HPPR1B roja	HPPR2 rosa	*Phaffia* Merck®
Humedad	2.70	4.57	3.40
Cenizas	12.30	15.09	11.8
Grasas	1.20	0.80	0.86
Proteína	43.30	40.49	35.45
Fibra	1.20	1.20	2.12
ELN	39.30	37.85	46.37

4.3.2 *Caracterización de carotenos*

Como se observaron en las placas cromatograficas (fig. 28), los carotenos de las levaduras experimentales HPPR1B, HPPR2, *S. exiguus* y la *Phaffia*, correspondieron a la astaxantina, zeaxantina, β-caroteno y otros no identificados, con los Rf de 95, 90, y 5 respectivamente. Se compararon con extractos de zanahoria, de flores de zempasuchil (80% de *trans* luteína, 4.5% de zeaxantina), LRM (zeaxantina), extracto de zanahoria (β-caroteno), de harina de camarón. Además los estándares de β-caroteno/zeaxantina, astaxantina de *Phaffia rhodozyma* Merck® y astaxantina sintética de La Roche®, llamado *Carophyll Pink*.

Además bajo la estimulación de la onda corta UV (236nm), se observaron tres manchas con alta intensidad fluorescentes color lila con Rf de 35, 70 y 85; y otras con menor intensidad en todas las muestras.

Identificación de carotenos por cromatografía en capa delgada

Carotenos	Rf*	Color
Astaxantina	95	rojo
Zeaxantina	90	amarillo
Desconocido	85	lila**
Desconocido	70	lila**
Desconocido	35	lila**
β-caroteno	5	rosa-naranja

* Factor de retardo o frente relativo

** Color por exposición a la luz ultravioleta (236nm).

La cuantificación de los carotenos totales por espectroscopía de absorción en el visible no se realizó en el laboratorio, primero no fue completa la extracción de los carotenos (87% de astaxantina) de la *Phaffia rhodozyma* Merck®. Además de los problemas para mantenerla estable; al sustituirla por la astaxantina sintética está fue parcialmente soluble en hexano y los carotenos de HPPR1 en hexano, al concentrarlos y recuperarlos en metanol se degradaban.

Las biomasas HPPR1 roja y HPPR2 rosa se analizaron por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los carotenos identificados fueron zeaxantina, *trans* luteína y otros carotenos no identificados; pero ninguno de estos correspondió a la astaxantina. Las muestras analizadas por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) y cuantificadas por espectroscopía de reflectancia, reportan que de los carotenos totales un 2.8% correspondía a la astaxantina

4.3.3 Perfil de aminoácidos

En la siguiente tabla se presentan los datos obtenidos del cromatograma de aminoácidos, sus tiempos de retención, que le permite identificarlo y su porcentaje en peso.

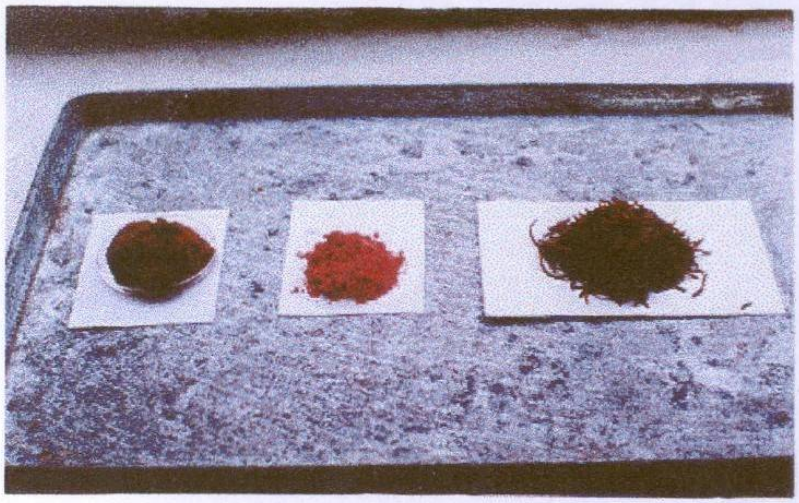


Figura 27.- De izquierda a derecha las Biomasas HPPR1B, HPPR2 y la dieta HPPR1 para los bioensayos.

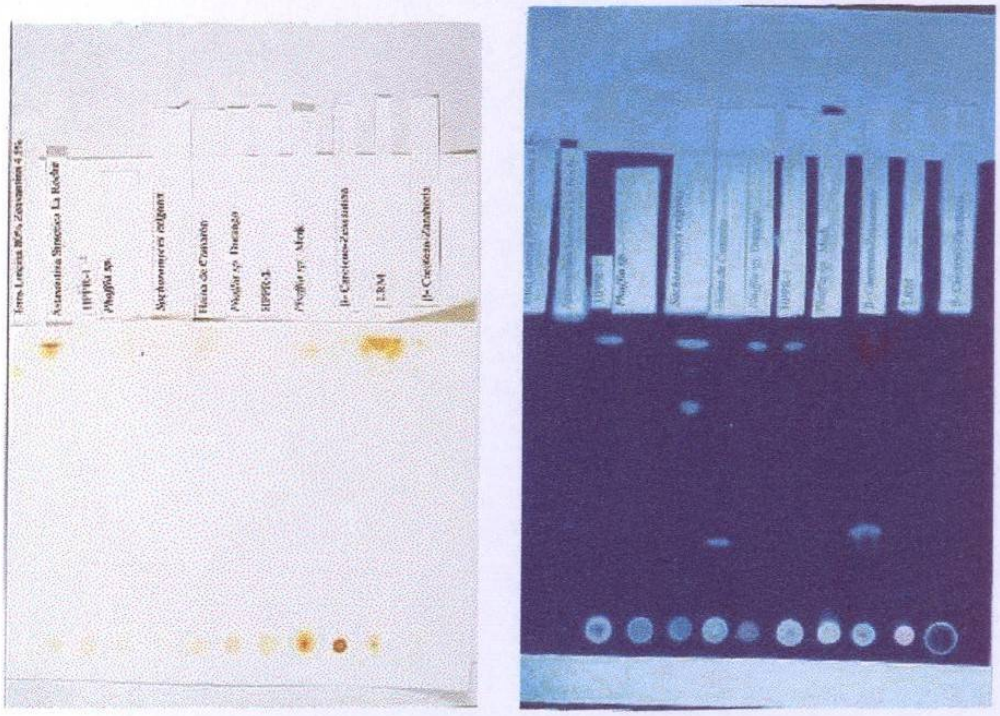


Figura 28.- Identificación de carotenos por cromatografía en capa delgada,observación directa y al UV.

Perfil de Aminoácidos

Número de Aminoácido	Tiempo de Retención	Nombre	Porciento en peso
1	7.79	Ácido aspártico	11.163
2	8.38	Treonina	5.780
3	11.08	Serina	6.237
4	13.01	Ácido Glutámico	12.732
5	14.04	Prolina	1.198
6	18.48	Glicina	10.245
7	19.95	Alanina	12.232
8	22.66	Cistina	0.612
9	25.39	Valina	6.083
10	26.82	Metionina	1.664
11	29.84	Isoleucina	4.581
12	30.65	Leucina	8.096
13	33.34	Tirosina	2.144
14	34.26	Fenilalanina	2.494
15	41.34	Histidina	1.702
16	44.34	Lisina	8.589
17	59.43	Arginina	3.298

* El Triptófano no se detectó, por lo tanto no fue cuantificado. El pico con tiempo de retención de 50, correspondió a un ion fosfato.

4.3.4 Digestibilidad de la proteína in vitro

Para la biomasa pigmentada se procesaron dos muestras (HPPR1 y HHPR2) y un control positivo la *Phaffia* Merck® en la siguiente tabla se muestran los resultados de digestibilidad, fibra y grasa en porciento en peso

	% Digestibilidad *in vitro*
HPPR1	51.56
HPPR2	97.35
Phaffia Merck®	82.21

ETAPA II - Evaluación Nutricional de la biomasa pigmentada HPPR1 en camarones blancos juveniles Litopenaeus vannamei

4.4 Bioensayo de crecimiento

4.4.1 Análisis proximal de ingredientes

Los resultados del análisis bromatológico de los ingredientes experimentales se muestran en la siguiente tabla. Los valores del porcentaje de grasa en la harinas de pescado y de camarón disminuyeron considerablemente como resultado de la delipidación y subsecuente despigmentación.

Análisis proximal de ingredientes en porcentaje (% en base húmeda)

Ingrediente	Proteina	Grasa	Fibra	Ceniza	ELN	Humedad
H. Pescado	71.93	9.30	0.58	14.60	1.56	1.99
H. Pescado1	74.58	0.41	0.22	14.73	1.33	8.70
Pasta Soya	46.12	0.89	2.23	6.86	39.52	4.37
H. Camarón	44.13	2.19	8.64	33.58	7.06	4.39
H. Camarón2	45.21	0.28	13.44	32.72	2.32	5.79
Gluten Trigo	75.36	0.91	0.12	1.56	11.42	5.46
H. Trigo	12.78	1.32	0.506	1.38	75.59	8.42

1,2 Ingredientes delipidados y despigmentados
ELN = Extracto libre de nitrógeno
H. = Harina

4.4.2 Análisis proximal de las dietas

Los resultados del analísis proximal de las dietas experimentales se resumen en la siguiente tabla. Los porcentajes en base seca obtenidos para todos los parámetros fueron homogéneos,. por lo que se consideran dietas isoproteicas, isolipídicas, isocalóricas y por igual la estabilidad de las dietas en el agua marina.

Análisis proximal de las Dietas experimentales del bioensayo de crecimiento (% en base húmeda)

Parámetros	D-HPPR1-10	D-Control-10
Humedad	8.2	9.5
Cenizas	5.6	5.0
Grasas	7.4	7.2
Proteína	31.4	31.4
Fibra	1.5	1.4
E.L.N	45.9	45.5
Kg calorías	434.33	430.79
p.m.s.	4.7	5.0

4.4.3 Evaluación biológica

4.4.3.1 Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos del agua marina de la sala de zootecnia del programa de maricultura durante el transcurso del primer bioensayo fueron registrados durante 5 semanas (1 de aclimatización y 4 del bioensayo) dentro de los siguientes rangos: Temperatura de 25 a 29 C, salinidad de 35 a 36ppt., el pH de 8.3 a 8.6, amoníaco 0.1ppm, los nitritos de 0 a 0.15ppm y nitratos de 25 a 28ppm.

4.4.3.2 Parámetros biológicos

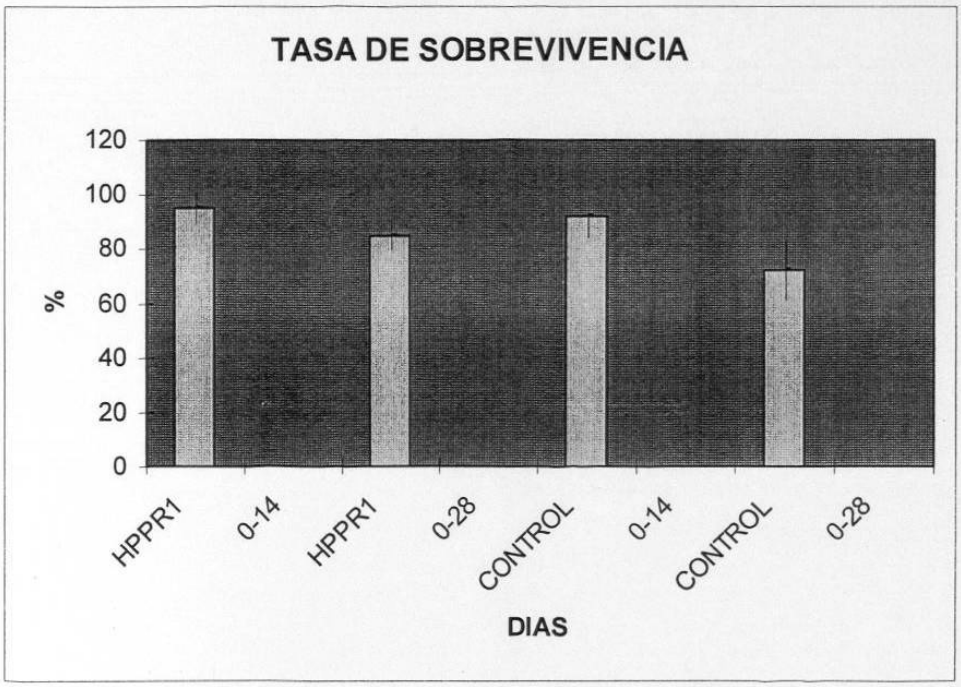
Los resultados promedio de la tasas de sobrevivencia, crecimiento, consumo, incremento y conversión alimenticia de las dos dietas experimentales. Después de los 14 y 28 días de experimentación se presentan en la siguiente tabla. Además los valores de la prueba "t"de Student para observar las diferencias.

Resultados promedio del bioensayo para evaluar crecimiento

Dietas Réplicas	Días	Control 5x10	HPPR1 4x10	Valor de t	Probabilidad
Tasa de	0-14	92	95	0.607	0.545
Sobrevivencia		8.36	5.77		
DS	0-28	72	85	2.129	0.578
		10.95	5.77		
Tasa de	0-14	21.70	31.45	1.184	0.366
Crecimiento		14.62	8.14		
DS	0-28	48.55	63.95	0.75	0.916
		24.22	22.62		
Tasa de	0-14	0.19	0.40	2.446	0.015*
Consumo		0.09	0.17		
DS	0-28	0.47	0.71	1.601	0.343
		0.20	0.26		
Tasa de	0-14	0.12	0.180	1.315	0.348
Incremento		0.08	0.05		
DS	0-28	0.27	0.370	1.134	0.84
		0.13	0.13		
Tasa de	0-14	13.51	2.23	-0.810	0.05
Conversión alimenticia		27.44	0.81		3.34
DS	0-28	2.04	2.08	0.045	0.839
		1.21	0.97		

** Significativo a un nivel de significancia de 0 .05.*

Los resultados demuestran que las tasas de sobrevivencia y crecimiento de 0-14 y 0-28 días de consumir la dieta experimental, no se observaron diferencias, a pesar que en los datos se muestra una tendencia de aumento. Por otra parte, se observan diferencias en un consumo mayor de la dieta experimental de los 0 a los 14 días (P=0.015), ver análisis estadístico en el anexo 2/1.



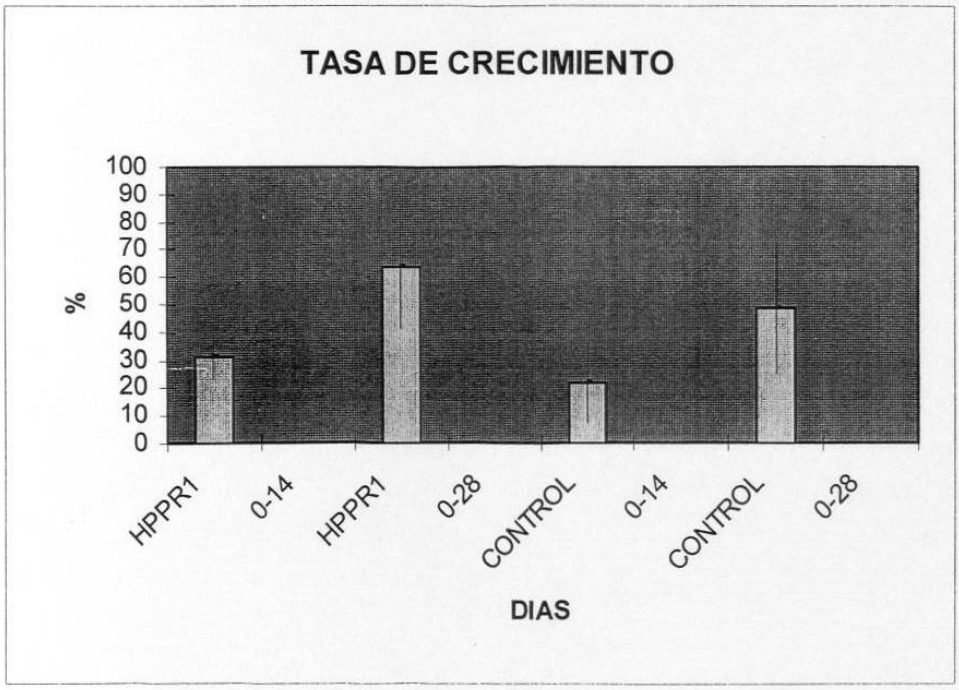


Figura 29.- Representación gráfica de las tasas de sobrevivencia (a) y crecimiento (b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente proteica.

4.5 Bioensayo de pigmentación

4.5.1 Análisis proximal de los ingredientes

Se utilizaron los mismos ingredientes del bioensayo de crecimiento (4.4.1)

4.5.2 Análisis proximal de la dieta

Los porcentajes en base seca obtenidos para todos los parámetros fueron homogéneos. Por otra parte, cabe mencionar que en la formulación teórica se restringió a un 30% el aporte de proteína por los ingredientes. Sin embargo, en las dietas se encontraron valores mayores a los esperados, pero este aumento fue similar en todas ellas, por lo que se consideran dietas isoproteicas, isolipídicas, pero no en cuanto a calorías.

Análisis proximal de las dietas experimentales del bioensayo de pigmentación (Porcentaje en base húmeda)

Parámetros	HPPR1	*Phaffia* Merck®	Control
Humedad	5.35	5.62	6.28
Cenizas	6.58	6.17	6.55
Grasas	7.96	7.69	7.5
Proteína	37.39	36.8	36.52
Fibra	1.1	0.86	1.03
ELN	41.62	42.85	42.12
Kg calorías	428.36	445.134	483.56
p.m.s	5.35	5.62	6.28

4.5.3 Evaluación nutricional

4.5.3.1 Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos del agua marina de la Sala de Zootecnia del Programa de Maricultura durante el transcurso del segundo bioensayo fueron registrados durante cinco semanas (uno de aclimatización y cuatro del bioensayo) dentro de los siguientes rangos: Temperatura de 25 a 29 C, salinidad de 35 a 36ppt., el pH de 8.3 a 8.6, amoniaco 0.1ppm, los nitritos de 0 a 0.15ppm y nitratos de 25 a 28ppm.

4.5.3.2 Parámetros biológicos

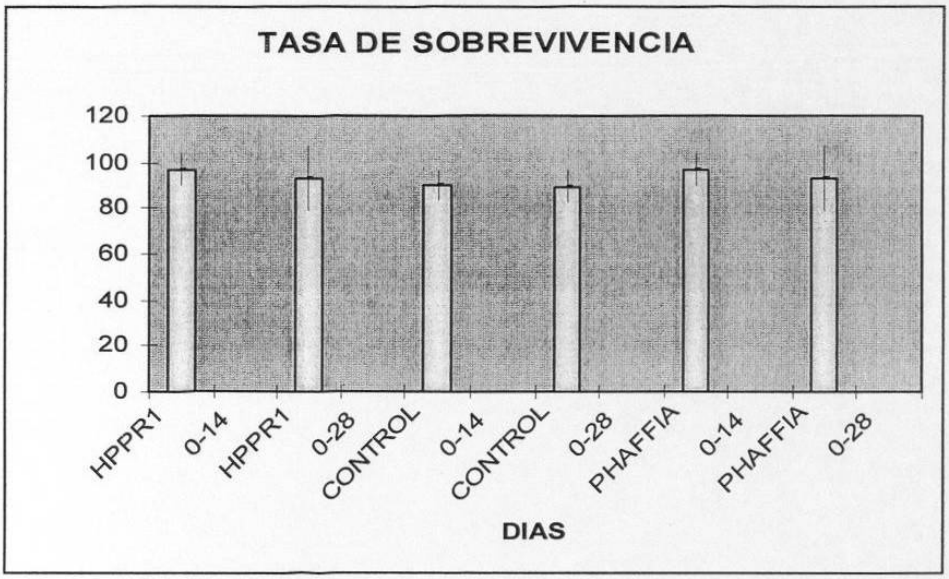
Los resultados promedio de la tasas de sobrevivencia, crecimiento, consumo, incremento y conversión alimenticia de las tres dietas experimentales; al final del bioensayo (28 días) se presentan en la siguiente tabla. Además se incluyen los valores de *F* y probabilidad de la ANOVA.

Resultados promedio del bioensayo para evaluar pigmentación

Dietas Réplicas	Días	Control 4x10	HPPR1 4x10	Phaffia 4x10	Valores de F/ Probabilidad
Tasa de	0-14	89.50	96.5	96.5	1.333
Sobrevivencia		7	7	7	0.311
DS	0-28	89.5	93	93	0.1111
		7	14	14	0.896
Tasa de	0-14	34.96	23.90	29.25	4.058
Crecimiento		4.98	6.72	4.52	0.055
DS	0-28	71.99	33.65	53.10	17.77
		9.52	11.97	3.73	0.001***
Tasa de	0-14	2.63	2.42	2.41	1.10
Consumo		0.33	0.21	0.12	0.37
DS	0-28	5.46	4.65	5.17	1.638
		0.87	0.60	0.31	0.247
Tasa de	0-14	0.87	0.65	0.65	1.77
Incremento		0.16	0.21	0.20	0.22
DS	0-28	1.79	0.91	1.37	13.17
		0.21	0.34	0.13	0.002***
Tasa de	0-14	3.08	3.94	3.98	1.13
Conversión alimenticia		0.6531	1.03	1.11	0.364
DS	0-28	3.04	5.72	3.80	3.15
		0.35	2.6	0.57	0.092

*** *Altamente significativo a un nivel de significancia de 0 .05 .*

Los resultados a los 0-28 días demuestran significativamente un aumento en la tasa de crecimiento e incremento en la dieta control, pero no para las dietas experimentales (P=0.001 y P=0.002 respectivamente), mientras que para la tasa de sobrevivencia, conversión alimenticia y consumo no se observaron diferencias entre las dietas, ver análisis estadístico en el anexo 2/2.



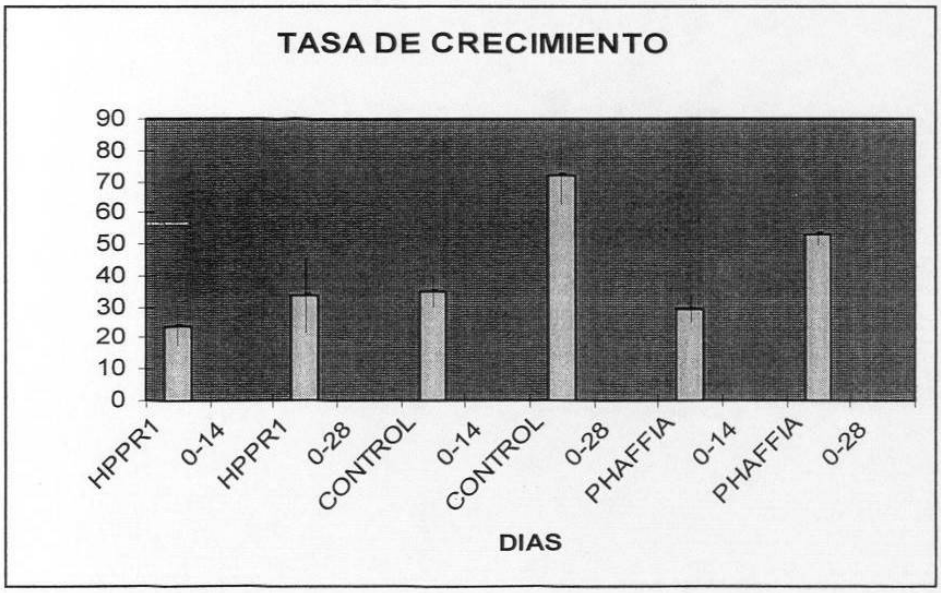
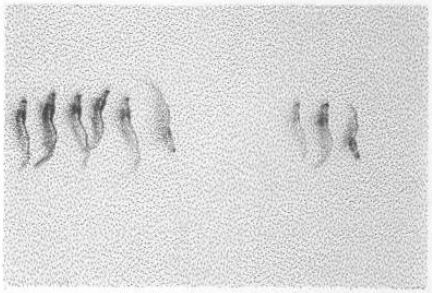


Figura 30.- Representación gráfica de las tasas de sobrevivencia (a) y crecimiento (b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente de pigmentos.

4.5.4 Evaluación de pigmentación

4.5.4.1 Relación hepatosomática

El análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas (P = 0.292), los valores de la relación hepatosomática fueron de menor a mayor, primero el control, seguido de HPPR1 y por último para la *Phaffia* (fig. 31 derecha); En la fig. 31 lado izquierdo, por apreciación visual, los hepatopáncreas fueron más pigmentados en los camarones alimentados con HPPR1 comparados con los controles.



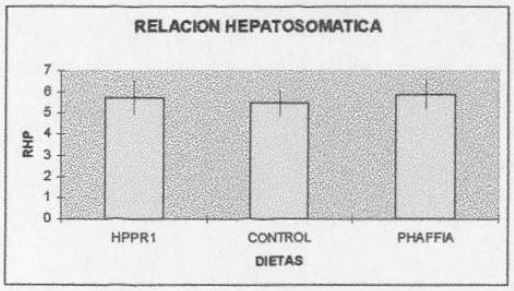


Figura 31.- Imágen de hepatopáncreas con las dietas HPPR1 y control. Gráfica de la relación hepatosomática.

4.5.4.2 Cuantificación de pigmentos

Para determinar la pigmentación en *L. vannamei,* se utilizaron dos métodos diferentes espectrofotométricos 1) absorción y 2) reflectancia. Después de los 28 dias los camarones alimentados con las tres dietas: *Phaffia,* HPPR1 y Control, se formaron dos grupos, el primero se fraccionó en dos: A) crudos y B) cocidos, además, cada uno se subdividió en cabeza, exoesqueleto y músculo. Los pigmentos se extrajeron con acetona-hexano y se leyeron en un espectrofotómetro a 470 nm. La curva se realizó en metanol por lo cual los cálculos se realizaron con el coeficiente de astaxantina en hexano.

Los resultados se muestran en la fig.32. Al aplicar una ANOVA no se encontraron diferencias, aunque existió una tendencia de aumento de pigmentación para los camarones alimentados con las dietas de *Phaffia* y HPPR1 en todas las subdivisiones de ambas fracciones, crudas o cocidas del camarón, con la excepción de la cabeza cocida del control.

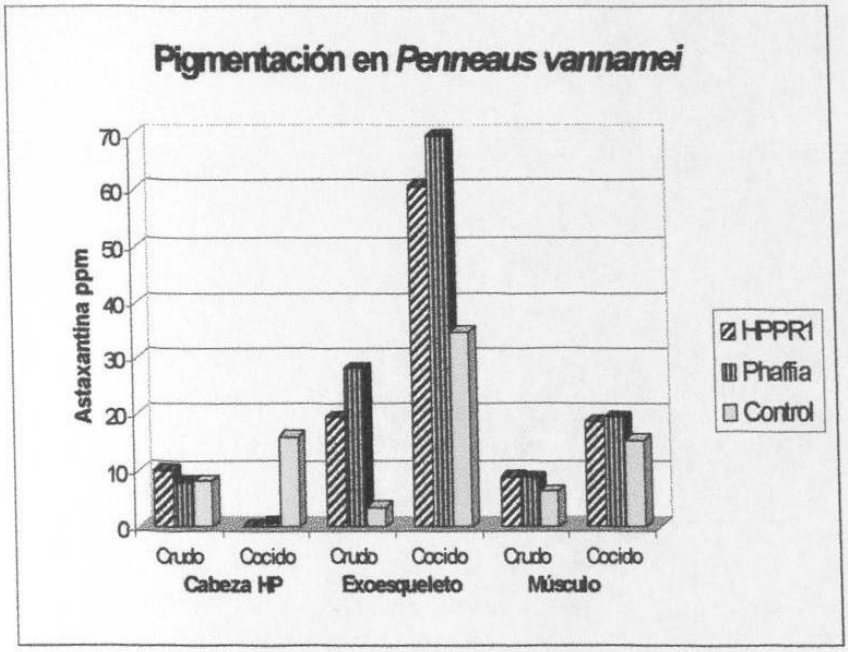


Figura 32.- Cuantificación de pigmentos por el método espectrofotométrico de absorción

En el segundo método, se compararon cuatro dietas: A: Control con dieta comercial suplementada con *artemia sp.*; B: HPPR1; C: Dieta control sin pigmentos; D: *Phaffia*.Se midió el color con un espectrofotómetro de reflectancia equipado con una lámpara de xenón, pulsado con una esfera para iluminación difusa y eliminar el efecto de direccionalidad, además un filtro UV y un adaptador en el área de exposición grande o pequeña para ser utilizado en el software Color Mentor(ver anexo II). Los resultados se analizaron, con los valores Z que representan la fuerza del pigmento. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.243$). Sin embargo, En las gráfica y fotografía de la fig. 34 se puede apreciar una tendencia en pigmentación mayor para el Control A, seguido de *Phaffia*, HPPR1 y por último la dieta C control sin pigmento adicional

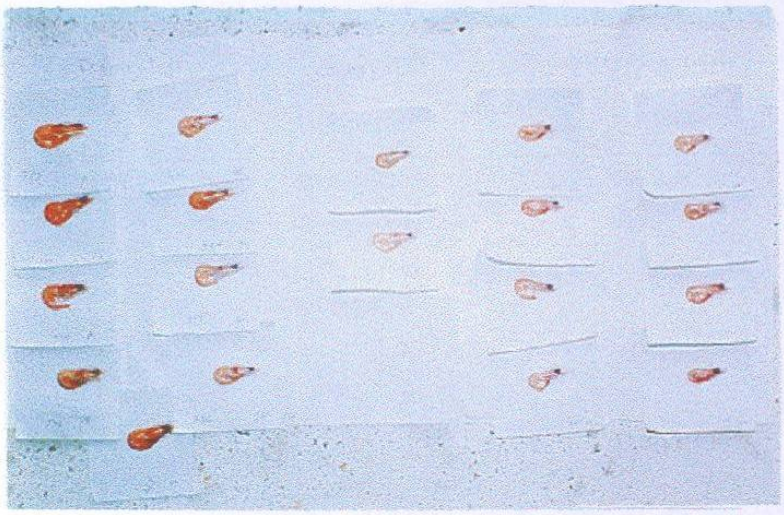
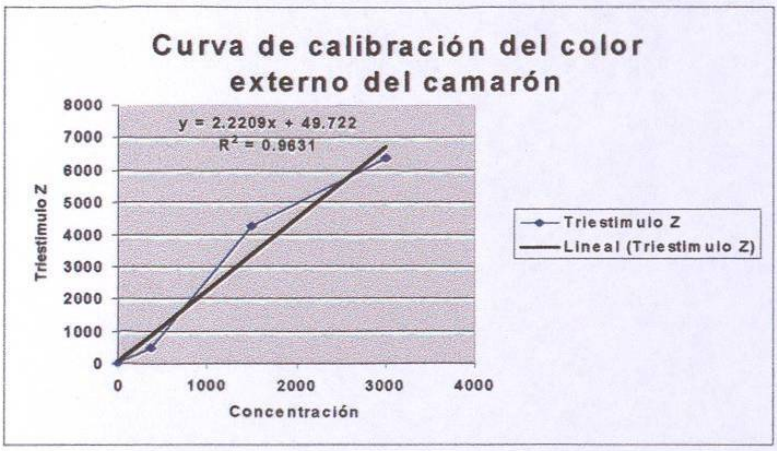


Figura 33.- Camarones cocidos: 9 HPPR1, 2 control, 8 contol-artemia



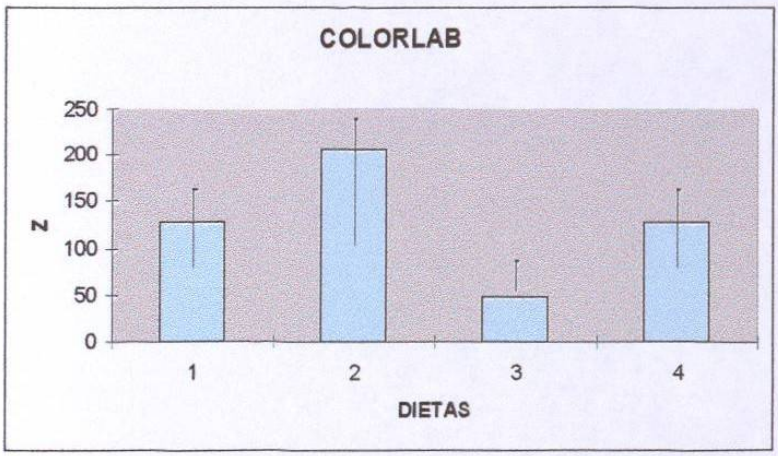
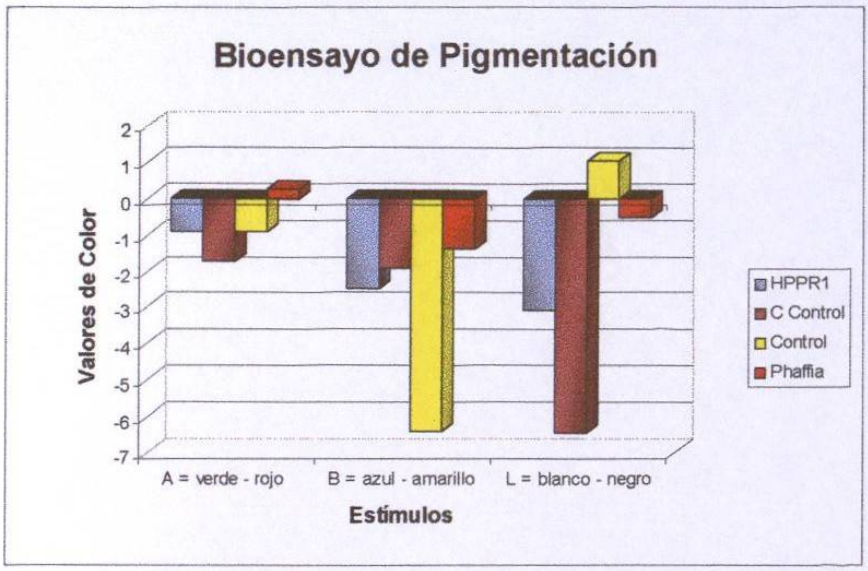


Figura 34.- Cuantificación de pigmentos por el método espectrofotométrico de reflectancia.

A continuación se muestran en la fig. 35 las gráaficas con los estímulos por separado: la primera el sistema Lab, donde L representa la luminosidad; A, el color de verde a rojo y B, de azul a amarillo. En la segunda se muestra la cromaticidad, el tono y brillantez.



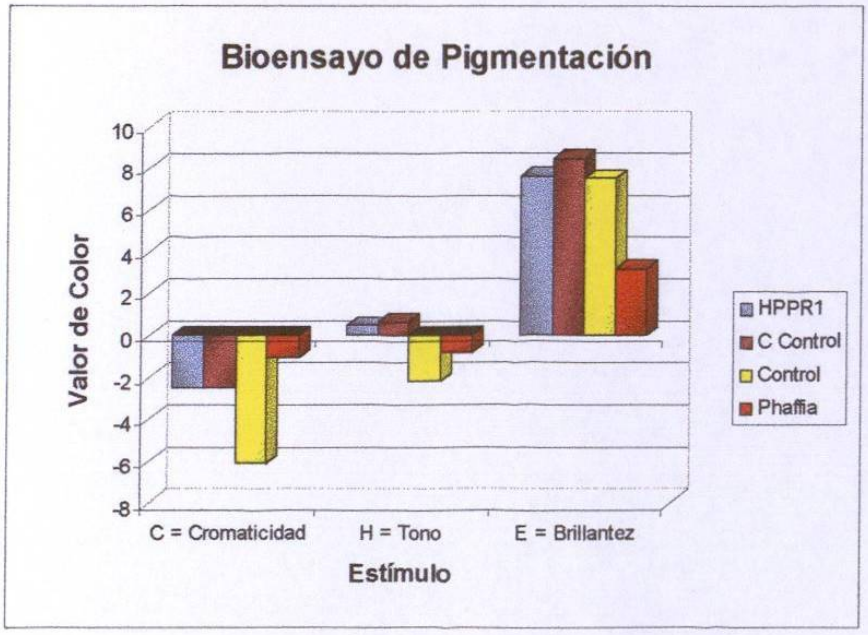


*Figura 35.- **Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría de reflectancia*** (L*a*b)(L*H*C)..

4.6 *Bioensayo para medir la digestibilidad de la proteína*

4.6.1 Análisis proximal de los ingredientes

Se utilizaron los mismos ingredientes del bioensayo I (4.4.1)

4.6.2 Análisis proximal de las dietas

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los parámetros del analísis proximal de las tres dietas elaboradas para el Bioensayo de digestibilidad del ingrediente: biomasas de HPPR2 y *Phaffia*. La dieta control es mezclada con las biomasas en una proporción 70:30. Las dietas son isoproteicas, e isolipídicas y solo el porcentaje de cenizas es alto, mientras que los carbohidratos son bajos para la biomasa HPPR2.

Análisis proximal de la dietas HPPR2-30, Phaffia-30 y Control-30

Parámetros	HPPR1	*Phaffia* Merck®	Control
Humedad	4.57	8.72	5.59
Cenizas	15.096	6.32	6.82
Grasas	8.0	10.82	9.96
Proteína	30.485	30.5	32.375
Fibra	1.2	1.8	1.3
ELN	40.649	41.84	43.955

4.6.3 Digestibilidad de la proteina

Como resultados de este bioensayo se observó una diferencia en la cantidad en promedio de heces totales de 4 replicados recolectadas en diez días de las dietas control, *Phaffia* y HPPR1 de 0.432, 0.650 y 0.899g respectivamente. Los resultados de la digestibilidad de la proteína para la dieta HPPR2-30 fue significativa (P=0.031), pero no para la digestibilidad de la materia seca (P=0.744)

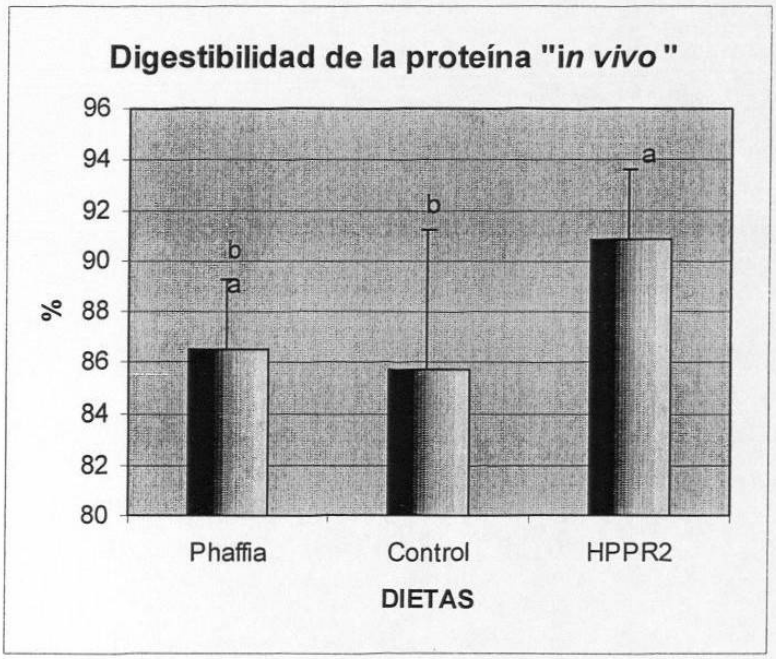


Figura 36.- Digestibilidad de la proteína "in vivo".

4.7 Bioensayo para medir la actividad inmunoestimulante

4.7.1 Evaluación nutricional

4.7.1.1 Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos del agua marina de la Sala de Zooctecnia del Programa de Maricultura fueron por igual a los otros bioensayos y también se verificó su calidad microbiológica.

4.7.1.2 Parámetros biológicos

Los resultados promedio de la tasas de sobrevivencia, crecimiento, conversión alimenticia, consumo, incremento y biomasa total de las cinco dietas experimentales al final del bioensayo (49 días) se presentan en la siguiente tabla. Además se incluyen los valores de *F* y probabilidad del analísis de ANOVA:

Resultados promedio bioensayo para evaluar inmunoestimulación

Dietas Réplicas	Días	Control 8x10	HPPR1 4x10	Phaffia 8x10	Saccha. 8x10	Glucan 8x10	Valores de F/P
TS	0-14	90	95	95	93.75	90	0.3859
DS		10.6	10	5.77	7.44	13.09	
TS	0-28	76.25	83.3	92.5	82.5	75	1.0534
DS		19.95	11.54	5	11.54	17.72	
TS	0-49	5625	76.65	77.50	71.25	47.50	4.605
DS		15.06	23.09	9.57	13.56	15.85	0.006***
TC	0-14	188.610	174.935	179.677	179.678	180.416	0.4311
DS		20.82	13.36	34.98	14.15	12.85	
TC	0-28	326.275	292.713	315.592	313.785	324.437	0.4584
DS		17.46	60.33	56.31	42.29	38.83	
TC	0-49	540.162	484.936	589.447	540.230	532.338	1.542
DS		36.90	74.89	84.33	64.65	65.37	0.196
TCA	0-14	2.198	2.195	2.147	2.178	2.258	0.1445
DS		0.2941	0.2634	0.2910	0.1974	0.3009	
TCA	0-28	3.3075	3.2067	2.6975	3.0338	3.2363	0.4942
DS		1.1313	0.4546	0.4759	0.5685	0.6800	
TCA	0-49	3.9325	3.2667	3.1925	4.3450	5.2800	1.4936
DS		0.7962	0.6553	0.8405	1.0952	2.8527	0.2330
C	0-49	9.6100	7.2867	8.600	9.9313	12.4913	1.6702
DS		1.7547	1.8745	2.4794	1.986	5.8441	0.1871
I	0-49	2.4538	2.2267	2.6950	2.3225	2.4288	1.5751
DS		0.1805	0.3443	0.3854	0.2817	0.2922	0.2106
BT	0-49	18.04	20.04	24.22	19.83	14.91	2.869
DS		4.66	4.08	2.25	4.48	5.85	0.043*

* Significativo, *** Altamente significativo a un nivel de significancia de 0.05