

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DESARROLLO DE UNA TECNICA DE
DIGESTIBILIDAD IN VITRO PARA EL CONTROI
DE HARINAS DE PESCADO Y ALIMENTOS
PARA CAMARON

TESIS

Por
MARTHA GUADALUPE NIETO LOPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Acuacultura

San Nicolás de los Garza, N. L.

Marzo, 2003

DESARROLLO DE UNA TECNICA DE DIGESTIBILIDAD IN
VITRO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE HARINAS DE
PESCADO Y ALIMENTOS PARA CAMARON

M. G. N. L.

TD
SH380
.62
.M6
N5
2003
c.1

200



1080124477

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE
DIGESTIBILIDAD IN VITRO PARA EL CONTROL
DE HARINAS DE PESCADO Y ALIMENTOS
PARA CAMARÓN

TESIS

Por
MARTHA GUADALUPE NIETO LOPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Acuicultura

San Nicolás de los Garza, N. L.

Marzo, 2003





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE HARINAS DE PESCADO Y ALIMENTOS PARA CAMARÓN

Por

MARTHA GUADALUPE NIETO LÓPEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Acuicultura**

San Nicolás de los Garza, N.L.

Marzo, 2003

SH380

.62

.M6

NS

2023



“Desarrollo de una técnica de digestibilidad *in vitro* para el control de calidad de harinas de pescado y alimentos para camarón.”

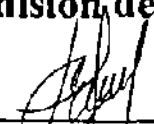
TESIS

Presentada por:


MARTHA GUADALUPE NIETO LÓPEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado
de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Acuicultura**


Comisión de Tesis



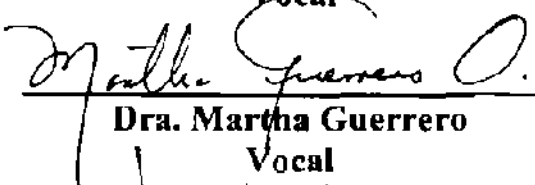
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez
Presidente y director



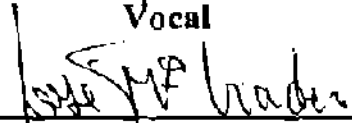
Dr. Denis Ricque Marie
Secretario y co-director



Dra. J. Marina Ezquerro Brauer
Vocal



Dra. Martha Guerrero
Vocal



Dr. José María Viader
Vocal

DEDICATORIA

A mis padres:

Juanita y José Ángel

por su cariño y comprensión.

A mi familia:

José Luis, Hiram Eduardo y Nereyda Linette

por todo lo que hemos compartido y por todo lo que nos falta
por compartir. **Los amo**



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo, pero especialmente deseo agradecer a la **Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez** y al **Dr. Denis Ricque Marie**. Por brindarme su apoyo y ser ejemplo de trabajo continuo, por impulsarme a superarme aún mas, por haberme brindado su valiosa amistad su cariño y respeto. Gracias por depositar su confianza en mí, espero no haberlos defraudado, pero sobre todo espero no defraudarlos nunca.

A la Dra. Marina Ezquerro B., por su apoyo en la estandarización de la técnica de pH-Stat, por sus consejos, por el interés demostrado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Martha Guerrero, por su apoyo y orientación en el manejo de las enzimas, por la revisión final de este trabajo.

Al Dr. J. María Viader, por su orientación y la revisión final de este trabajo.

Al Dr. Ian H. Pike, por sus consejos, por haberme proporcionado las harinas de pescado utilizadas en este trabajo.

Al Q.B.P. Claudio Guajardo Barbosa, con quien entable lazos muy fuertes de amistad, por su interés y la orientación que me brindo durante la estandarización de las técnicas.

A la Lic. Adriana García Flores, por su ayuda incondicional y sobre todo por su amistad.

A CONACYT, por la beca otorgada para que me permitió realizar mis estudios de Doctorado.

A CONACYT, por su apoyo económico en el proyecto clave 17100-5-1575-A9208. "Determinación de algunos factores que afectan el valor nutricional y biotóxicológico de las harinas de pescado usadas en las dietas balanceadas para el camarón blanco *Penaeus vannamei*."

A la Comunidad Económica Europea, por su apoyo económico en el proyecto CH-CT93-0300. "Determination of some factors affecting the nutritional and biotoxicological value of fish meal for use in feed for shrimp culture and establishment of quality control norms".

A todos mis compañeros de laboratorio, con quienes compartí muchos momentos agradables, muchas gracias por su amistad: Mireya Tapia Salazar, Laura M. Treviño, Adriana García Flores, Sandra Edith de la Cruz, Graciela García D.

A mis compañeros de la Maestría (R.A.P.A.), Adrián Salgado Vargas, Martín Camarena Conchas y Alejandra Rocha E. Les agradezco profundamente su amistad y cariño.

Índice

1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Calidad de las proteínas y las harinas de pescado.	2
2.2 Importancia de la determinación de la digestibilidad.	5
2.3 Digestibilidad <i>in vitro</i>	6
2.4 Estudios de digestibilidad <i>in vitro</i>	9
3 IMPORTANCIA	11
4 OBJETIVO GENERAL	11
5 OBJETIVOS PARTICULARES	11
6 ORIGINALIDAD.....	12
7 HIPÓTESIS	12
8 MATERIAL Y MÉTODO.....	12
8.1 Determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i>	13
8.1.1 Harinas de pescado experimentales.....	13
8.1.2 Dietas experimentales	15
8.1.2.1 Formulación y composición de las dietas.	15
8.1.2.2 Preparación de las dietas.	16

8.1.2.3	Análisis de lixiviación de la dieta	17
8.1.3	Sala de bioensayos	19
8.1.4	Características y distribución de los organismos.	19
8.1.5	Análisis estadístico	19
8.1.5.1	Digestibilidad <i>in vivo</i> en camarón	19
8.1.5.2	Correlación con digestibilidad <i>in vivo</i> es otras especies	20
8.2	Determinación de digestibilidad <i>in vitro</i>	20
8.2.1	Método medición de la tasa inicial de hidrólisis	20
8.2.1.1	Obtención del homogeneizado enzimático	20
8.2.1.2	Preparación del extracto enzimático	20
8.2.1.3	Medición de la actividad enzimática del homogeneizado.....	21
8.2.1.4	Estandarización de la técnica de pH-Stat. (ver anexo 1 ^a).....	21
8.2.2	Método de determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> con pepsina diluida (A.O.A.C., Torry modificado).....	22
8.2.3	Método de determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> con tripsina bovina (tipo A.O.A.C., Torry modificado).....	23
8.2.3.1	Determinación de la concentración enzimática:.....	23
8.2.3.2	Condiciones de digestión (Ver diagrama en Anexo 2).	24
8.2.3.3	Determinación de los productos de reacción o del sustrato residual (control de la hidrólisis).....	24
8.2.3.4	Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> para las diferentes harinas de pescado.....	25

8.2.3.5	Determinación del tiempo de incubación.....	25
8.2.4	Método de determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> con enzimas de camarón (tipo A.O.A.C., Torry modificado)	25
8.2.4.1	Determinación de la concentración enzimática:.....	25
8.2.4.2	Condiciones de digestión (Ver diagrama en Anexo 3).	26
8.2.4.3	Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> para las diferentes harinas de pescado.....	27
8.2.4.4	Análisis estadístico.....	27
8.2.5	Determinación de digestibilidad <i>in vitro</i> en otros ingredientes.....	27
9	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	29
9.1	Análisis Proximal de las harinas de pescado	29
9.2	Análisis proximal y lixiviación de las dietas.....	32
9.3	Evaluación de la digestibilidad <i>in vivo</i>	33
9.3.1	Determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i> en camarón	33
9.3.2	Correlación con la digestibilidad <i>in vivo</i> en otras especies.....	36
9.4	Determinación del grado de hidrólisis (DH) utilizando pH-Stat para camarón.	41
	DHcorHP	45
9.5	Determinación de la digestibilidad con pepsina (A.O.A.C., Torry modificado).....	46
9.6	Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> con tripsina bovina (Tipo A.O.A.C.).	51
9.6.1	Determinación de los productos de reacción o del sustrato residual (control de la Hidrólisis).....	51
9.6.2	Determinación de la duración de la hidrólisis.....	52
9.6.3	Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i> para las diferentes harinas de pescado. ..	54

9.7	Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> con enzimas de camarón (Tipo A.O.A.C.).	55
9.8	Determinación de digestibilidad <i>in vitro</i> en otros ingredientes.	61
10	CONCLUSIONES	65
11	BIBLIOGRAFÍA	66
12	ANEXOS	77

Índice de tablas

Tabla 1.- Comparación de algunos métodos para determinar la digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas (Tomado de Carrillo, 1994).	8
Tabla 2.- Características de las harinas de pescado experimentales	14
Tabla 3.- Resultados de digestibilidad aparente de la proteína en mink (proteína verdadera),	15
Tabla 4.- Composición de las dietas del bioensayo de digestibilidad <i>in vivo</i> .	16
Tabla 5.-Actuidades proteolíticas comparadas de la pepsina porcina y la tripsina bovina.	23
Tabla 6.- Digestibilidad <i>in vivo</i> de diferentes ingredientes (DAPI) y dietas (DPD).	28
Tabla 7.- Análisis proximal de los ingredientes a probar (base húmeda).	30
Tabla 8.- Análisis proximal de las dietas (base húmeda) y pérdida de material.	32
Tabla 9. Digestibilidad en camarón de las dietas e ingredientes de prueba.	34
Tabla 10. Digestibilidad aparente de la materia seca en dietas (DAMSD) e ingredientes prueba (DAMSHP), corregida por las pérdidas de nutrientes en agua antes de la ingestión (LIXCOR).	35
Tabla 11. – Coeficiente de correlación (r y r2) de las DAPHP en camarón con mink (n=15), trucha y salmón (n=13)	37
Tabla 12.- Resultados del método pH stat con enzimas de camarón. Grado de hidrólisis de las harinas de pescado y dietas.	43
Tabla 13. Predicción de la digestibilidad proteica de la harina de pescado (DAPHP) a partir del grado de hidrólisis medido en el pH-Stat con enzimas de camarón (DHcorHP) (se aplicó la correlación obtenida excluyendo las harinas 3664 y A3481, de bajo contenido proteico y alta ceniza: $DAPHP = 60.918 + 1.2965 * DHcorHP$).	45
Tabla 14. Digestibilidad de las harinas de pescado y dietas utilizando pepsina diluida (método AOAC, Torry modificado), sin corrección por la proteína soluble en ácido.	47
Tabla 15. Predicción de la DAPHP a partir de la digestibilidad con pepsina sin corrección por proteína soluble en ácido ($DAPHP = 59.55 + 0.3726 * Digestibilidad \text{ con pepsina.}$)	48
Tabla 16. Digestibilidad de la harina de pescado utilizando el método de pepsina corregida por la solubilidad de la proteína en ácido.	49

Tabla 17. Coeficiente de correlación y probabilidades (r y P) de la DAPHP en camarón con la digestibilidad obtenida con el pH-Stat en camarón, la digestibilidad con pepsina diluida (no corregida por la solubilidad de la proteína en ácido) y el contenido de proteína soluble en ácido, para las diferentes harinas seleccionadas.	50
Tabla 18. Coeficiente de correlación y probabilidades (r y P) de la digestibilidad con pH-Stat en camarón con la digestibilidad con pepsina diluida (no corregida) y la proteína soluble, para los diferentes grupos de harinas.	50
Tabla 19.- Resultados de proteína solubilizada en mg/ml (D.O. 280nm) a diferentes tiempos ...	53
Tabla 20.- Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> con tripsina de las harinas de pescado	54
Tabla 21.- Digestibilidad <i>in vitro</i> con enzimas de camarón.	57
Tabla 22.- Digestibilidad <i>in vitro</i> de ingredientes (DPI) y dietas (DPD) con enzimas de camarón	61

Índice de figuras

Figura 1.- Correlación de la digestibilidad en camarón y salmón (trat D),	38
Figura 2.- Correlación de la DAMSHP en camarón con DAPHP en salmón (Trat D) excluyendo las harinas de baja proteína/alta ceniza, con o sin corrección por lixiviación.	38
Figura 3.- Correlación de la DAPHP en trucha, mink y salmón con la DAPHP (IAPD), DAMSHP (IADMD) y DAMSHP lixcor en camarón (n=10).	38
Figura 4.- Cinética del grado de hidrólisis de harinas de anchoveta hechas con material prima de diferente frescura (Descompuesta, médium, Fresca) y de harina de arenque procesadas a baja temperatura (539/93) o alta temperatura (163/94).	42
Figura 5.- Regresión lineal entre digestibilidad <i>in vivo</i> (DAPHP = FMAPD) y D _{hcor} HP(=FMDH _{cor} .) a) sin harinas altas en ceniza/baja proteína b) sin harinas con proteína < 70%.	44
Figura 6.- Regresión lineal entre la digestibilidad <i>in vitro</i> con pepsina diluida (sin corrección por proteína soluble) y la digestibilidad <i>in vivo</i> (DAPHP = FMAPD).	48
Figura 7.- Digestibilidad de la harina de pescado Tepual con tripsina bovina 0.0005%.	51
Figura 8.- D.O. Curva de regresión ajustada	52
Figura 9.- determinación del tiempo de duración de la hidrólisis.	53
Figura 10.- Curvas de hidrólisis para las harinas de pescado a 24 horas	55
Figura 11.- Curvas de hidrólisis para las dietas a 24 horas.	56
Figura 12.- Correlación entre digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas a 6 horas de	58
Figura 13.- Correlación entre la digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas de pescado	58
Figura 14.- Correlación entre la digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas de pescado	59
Figura 15.- Correlación entre la digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas de pescado	59
Figura 16.- Correlación entre la digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas de pescado	60
Figura 17.- Correlación entre digestibilidad <i>in vitro</i> de las dietas a 24 horas de	60
Figura 18.- Correlación entre digestibilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de las dietas para <i>L. stylirostris</i> . ..	62
Figura 19.- Correlación entre digestibilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los ingredientes para <i>L. stylirostris</i>	62
Figura 20.- Correlación entre digestibilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los ingrediens para <i>L. stylirostris</i> eliminando la harina de trigo.	63

Figura 21.- Correlación entre digestibilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de las harinas de origen animal para <i>L. stylirostris</i>	63
Figura 22.- Correlación entre digestibilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de las dietas de origen animal para <i>L. stylirostris</i>	64

RESUMEN

Martha Guadalupe Nieto López

Fecha de Graduación: Marzo, 2003

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: **DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE HARINAS DE PESCADO Y ALIMENTOS PARA CAMARÓN.**

Número de páginas: 77

Candidato para el Grado de
**DOCTOR EN CIENCIAS con
especialidad en Acuicultura.**

Área de Estudio: Nutrición Acuícola

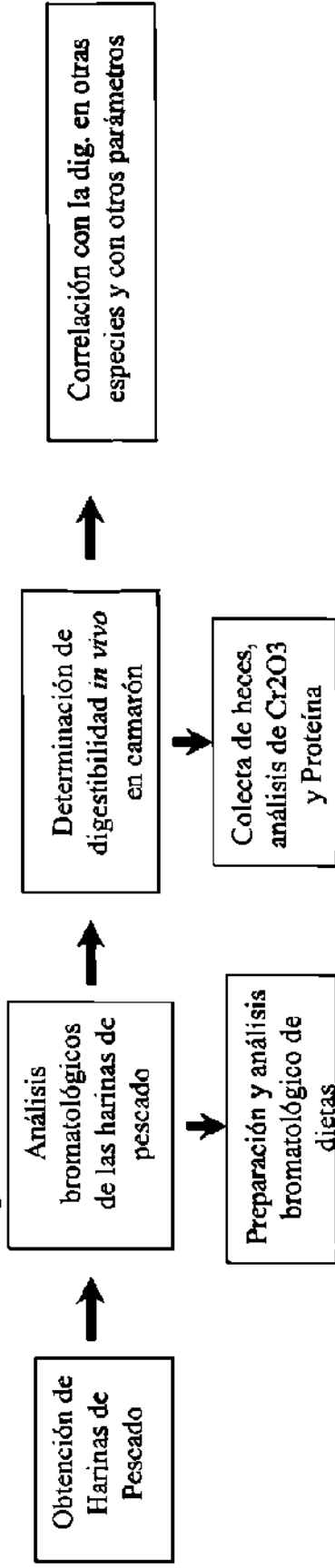
Propósito y Método del Estudio: Entre las técnicas de evaluación nutricional oficiales, existen algunas técnicas químicas que se pueden aplicar independientemente de la especie a alimentar, pero en otros casos es indispensable que los resultados *in vitro* sean validados con bioensayos o evaluaciones *in vivo*; tal es el caso de las técnicas de digestibilidad o disponibilidad de proteína, que constituyen un parámetro de calidad muy importante no solo desde los puntos de vista nutricional y económico, sino también desde el punto de vista de impacto ambiental. Considerado la importancia de contar un método de digestibilidad de proteínas *in vitro* que permita hacer una selección adecuada de ingredientes y de alimentos para camarón, pero que además permita seleccionar entre calidades de un mismo ingrediente proteico, en este trabajo se propuso evaluar la correlación de la digestibilidad *in vivo* vs. la digestibilidad *in vitro* de los resultados obtenidos con las metodologías AOAC y la metodología desarrollada para camarón mas eficiente reportada hasta el inicio de este trabajo (pH-stat), utilizando como sustrato 15 harinas de pescado de calidad variable, previamente evaluadas en salmónidos y en mink, así como otros ingredientes (Pasta de soya, harina de pluma, harina de camarón, harina de calamar, harina de trigo, gluten de trigo y dos harinas de pescado) y alimentos balanceados terminados.

Contribuciones y Conclusiones: El camarón *L. vannamei* de 0.4g es muy sensible a los parámetros de calidad de las HP tales como exposición a la temperatura y contenido de proteína soluble, en términos de digestibilidad aparente de la proteína. La digestibilidad proteica obtenida en salmónidos, trucha o mink no puede ser un buen indicador para la nutrición de camarón, debe ser reemplazada por los métodos de digestibilidad *in vitro* a) con pepsina diluida (A.O.A.C. Torry modificado) para harinas de pescado pero no para dietas, b) utilizando extractos crudos de hepatopáncreas: pH-Stat para harinas con alta proteína/baja ceniza, o determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (Tipo A.O.A.C. no corregido) para harina de pescado, dietas u otros ingredientes de origen animal.

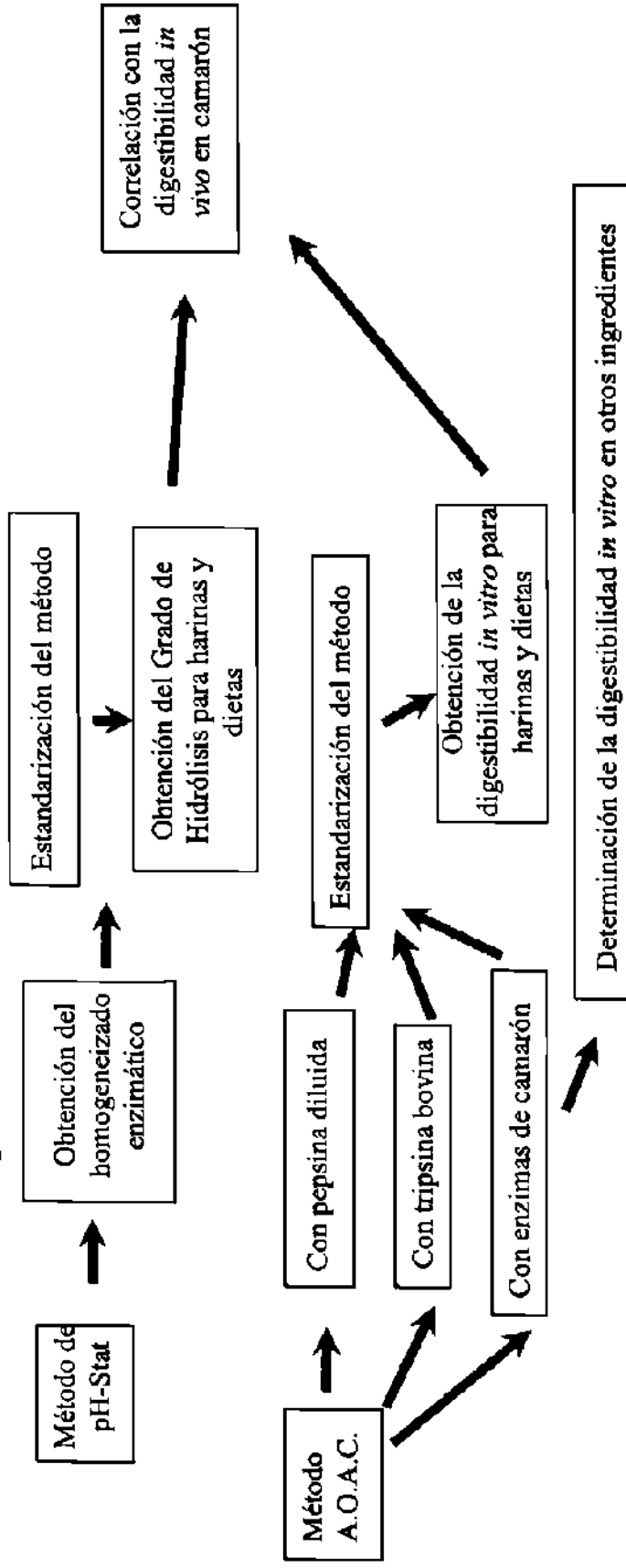
FIRMA DEL ASESOR: _____

MATERIAL Y MÉTODO

Determinación de digestibilidad *in vivo*



Determinación de digestibilidad *in vitro*



RESUMEN

En el presente estudio se determinó la digestibilidad proteica de 15 harinas y un hidrolizado de pescado *in vivo* (0.4g *P. vannamei*) utilizando óxido de cromo como marcador inerte y comparándola con estudios obtenidos con métodos *in vitro*: método de pH-Stat en camarón (utilizando un extracto crudo del hepatopáncreas como fuente de enzima) y varios métodos tipo A.O.A.C. utilizando pepsina diluida (método oficial modificado por el laboratorio de Torry para su uso en harinas de pescado), pero también tripsina bovina o un extracto crudo de hepatopáncreas de camarón. La digestibilidad proteica de las harinas de pescado había sido evaluada en mink (un experimento con 15 muestras presentó un rango de 83.1-94.7%), trucha (dos experimentos, n=13, 87.1-97.9%) y salmón (tres experimentos, n=13, 76.2-90.7%).

La digestibilidad aparente de la proteína de las harinas de pescado en camarón (DAPHP) varió de 75.8 a 98.7%, y fue muy afectada por la exposición a la temperatura durante el secado, pero no por la frescura de la material prima, y se incrementa significativamente con el contenido de proteína soluble en la harina de pescado o el hidrolizado. La correlación entre la digestibilidad de la proteína en camarón y en otras especies fue significativa solo en dos de los tres tratamientos para salmón, pero no para trucha o mink. No obstante, la digestibilidad aparente de la material seca en camarón (DAMSHP) se correlacionó significativamente con la digestibilidad proteica en salmón, siempre y cuando las harinas presentaran un contenido de proteína superior a 65% y un contenido de ceniza inferior a 15%.

El grado de hidrólisis obtenido por el método de pH-Stat mostró un rango de 13.6 a 35.4%, y no se correlacionó significativamente con DAPHP en camarón, aún cuando las harinas con bajo contenido de proteína/alta ceniza fueran eliminadas. Para las HP con contenido proteico más alto que 65% y contenido de ceniza más bajo que 15%, se obtuvo una ecuación de regresión significativa ($R^2=0.64$, $p=0.0006$, $n=14$): $DAPHP = 1.3 DH + 61$.

La digestibilidad proteica en pepsina diluida fue expresada en porciento de la proteína soluble (e.g. corregida por la solubilidad proteica en una solución ácida) o de la proteína total en la muestra (ej. Sin corregir). La digestibilidad con pepsina no corregida muestra valores que van de 42.7% a 86.3%, y su correlación con la DAPHP en camarón ($R^2=0.67$, $p=0.00008$, $n=16$) fue mayor que para los valores corregidos. Además la regresión no fue afectada por la presencia de HP con baja proteína/alta ceniza y por lo tanto puede ser aplicada a cualquier HP: $\%DAPHP = 59.6 + 0.373 (\% \text{ Digestibilidad con pepsina diluida no corregida})$.

La digestibilidad proteica con tripsina bovina (tipo A.O.A.C.), fue expresada también como corregida o no corregida por la solubilidad de la proteína en buffer ligeramente alcalino (pH8). La digestibilidad con tripsina no corregida tuvo un rango de 50.82% a 95.13% y su correlación con la DAPHP en camarón ($R^2=0.042$) fue todavía más baja que para la digestibilidad con tripsina corregida ($R^2=0.18$) contrario a lo esperado.

La digestibilidad proteica *in vitro* (tipo A.O.A.C.), con extracto enzimático del hepatopáncreas de camarón, obtuvo un rango de 36.8 a 64.16 y de 24.16 a 92.25 para las dietas y IIP a 6 horas de hidrólisis respectivamente y para las HP a 24 horas el rango va de 42.7 a 94.4. Se encontró una correlación significativa ($p<0.05$) entre las digestibilidades proteicas de las dietas *in vivo* e *in vitro* ($r^2=0.6$, $p=0.0005$, $n=16$), así como entre las digestibilidades proteicas de la harina *in vivo* e *in vitro* a 6 y 24 horas de hidrólisis ($r^2=0.54$, $p=0.001$; $n=16$ y $r^2=0.8$, $p=0.000003$; $n=16$ respectivamente). Estas dos últimas correlaciones mejoran cuando no se considera las harinas de pescado de más de 14.5% de ceniza ($r^2=0.64$, $p=0.0017$, $n=12$ y $r^2=0.86$, $p=0.00001$, $n=12$ respectivamente).

La digestibilidad proteica *in vitro* para diferentes ingredientes (DPI-24h) y dietas (DPD-24h) con un extracto hepatopancreático de *L. stylirostris* presenta una correlación significativa con la digestibilidad *in vivo* ($p<0.05$) para las dietas ($r=0.76$), pero no para los ingredientes ($r=0.46$); sin embargo al eliminar la harina de trigo la correlación mejoró significativamente ($r=0.87$). Los correspondientes coeficientes de correlación entre la digestibilidad proteica *in vivo* e *in vitro* para dietas y harinas con el homogeneizado enzimático de *L. vannamei*, no fueron significativos.

En conclusión que el camarón *L. vannamei* de 0.4g es muy sensible en términos de digestibilidad aparente de la proteína de las HP, a los parámetros de calidad, tales como exposición a la temperatura y contenido de proteína soluble. La digestibilidad proteica obtenida en salmónidos, trucha o mink no puede ser un buen indicador para la nutrición de camarón, debe ser reemplazada por los métodos de digestibilidad *in vitro* a) con pepsina diluida (A.O.A.C. Torry modificado) para harinas de pescado pero no para dietas, b) utilizando extractos crudos de hepatopáncreas: pH-Stat para harinas con alta proteína/baja ceniza, o determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (Tipo A.O.A.C. no corregido) para harina de pescado, dietas u otros ingredientes de origen animal.

Palabras clave: Calidad proteica, digestibilidad; camarón; harina de pescado.

ABSTRACT

In the present study, protein digestibility of 15 fish meals and one fish hydrolysate was determined *in vivo* (0.4g *P.vannamei*) using Cr_2O_3 as an inert tracer, and compared to the results of *in vitro* hydrolysis methods: shrimp pH-Stat method (using a crude extract from shrimp hepatopancreas as enzyme source) and the method using dilute pepsin A.O.A.C. Torry modified, bovine trypsin or a crude extract from shrimp hepatopancreas. Most of the 16 samples had been tested previously in various facilities for their protein digestibility in mink (one trial on 15 samples ranging 83.1-94.7%), trout (two trials, n=13, 87.1-97.9%) and salmon (three trials, n=13, 76.2-90.7%).

Apparent protein digestibility in shrimp (FMAPD) varied between 75.8 and 98.7%, was strongly affected by the temperature exposure in dryer but not by the raw material freshness, and increased significantly with the content of soluble protein in the tested fish meal or hydrolysate. Correlation between protein digestibility in shrimp and other species was found to be barely significant only in two of three trials for salmon, but not significant for trout or mink. However, fish meal dry matter digestibility in shrimp (FMADMD) was significantly correlated with protein digestibility in salmon, provided that fish meal protein content was higher than 65% and ash content lower than 15%.

Degree of hydrolysis (DH) by shrimp pH-Stat method ranged from 13.6 to 35.4%, and was not correlated significantly with FMAPD in shrimp, unless low protein/high ash fish meals were excluded from the data base. For fish meals which protein content was higher than 65% and ash content lower than 15%, a significant regression equation was obtained ($R^2=0.64$, $p=0.0006$, $n=14$): $FMAPD = 1.3 DH + 61$.

Protein digestibility in dilute pepsin was expressed as a percent of either insoluble (i.e. corrected for protein solubility in a weak acid solution) or total crude protein in sample (i.e. uncorrected). Uncorrected pepsin digestibility ranged from 42.7% to 86.3%, and its correlation with FMAPD in shrimp ($R^2=0.67$, $p=0.00008$, $n=16$) was better than for the corrected expression. Moreover, the regression was not affected by the presence of low protein/high ash fish meals and therefore might be applied to any fish meal: $\%FMAPD = 59.6 + 0.373 (\% \text{uncorrected dilute pepsin digestibility})$.

Protein digestibility with bovine trypsin was expressed too as corrected or uncorrected for protein solubility in pH 8 buffer. Uncorrected trypsin digestibility ranged from 50.82% to 95.13% and its correlation with FMAPD in shrimp ($r^2=0.042$) was still lower than for the corrected digestibility with trypsin ($r^2=0.18$) contrary to the expected.

The *in vitro* protein digestibility (AOAC type), with enzymatic extract of shrimp hepatopancreas, ranged 36.8 to 64.16 and 24.16 to 92.25 for the diets and FM at 6 hours of hydrolysis respectively, and for the HP at 24 hours the range was 42.7 to 94.4. There was a significant correlation ($p < 0.05$) between the *in vivo* and *in vitro* protein digestibility for the diets ($r^2=0.6$, $p=0.0005$, $n=16$) as well as between the *in vivo* protein digestibility for the FM and *in vitro* at 6 or 24 hours of hydrolysis ($r^2=0.54$, $p=0.001$, $n=16$ and $r^2=0.8$, $p=0.000003$, $n=16$ respectively). These last two correlations improve when the FM containing more than 14.5% ash are not considered ($r^2=0.64$, $p=0.0017$, $n=12$ and $r^2=0.86$, $p=0.00001$, $n=12$ respectively).

The *in vitro* protein digestibility for several ingredients and diets with a *L. stylirostris* hepatopancreatic extract correlated significantly with the *in vivo* digestibility ($p < 0.05$) for the diets ($r=0.76$), but not for the ingredients ($r=0.46$); However upon eliminating the wheat flour the correlation improved significantly ($r=0.87$). The corresponding coefficients of correlation between the *in vivo* and *in vitro* protein digestibility for diets and flours with the enzymatic homogenized of *L. vannamei*, were not significant.

It can be concluded that 0.4g *L.vannamei* are very sensitive to fish meal quality parameters such as temperature exposure and soluble protein content in terms of apparent protein digestibility. The protein digestibility obtained for salmonids, trout or mink cannot be used as a indicator for shrimp nutrition, and should be replaced by *in vitro* digestibility methods a) by using dilute pepsin (AOAC, Torry modified) for a large range of fish meals but not for diets b) by using an hepatopancreas crude extract: shrimp pH-Stat for high protein/low ash fish meals, or determination of the *in vitro* digestibility with shrimp enzymes (A.O.A.C Type, corrected) for fish meals, diets or other animal ingredient.

Keywords: Protein quality, digestibility, shrimp; fish meals.