

1 INTRODUCCIÓN

La industria del cultivo de camarón se ha expandido en forma espectacular en los últimos años. Actualmente se producen en el mundo aproximadamente 1 millón 300 mil toneladas. México reporta una producción de 35 000 ton en 2002 y aunque no figura entre los principales productores en el contexto mundial, tiene un alto potencial de crecimiento considerando las extensas áreas costeras (235,000 hectáreas aproximadamente) con las que cuenta.

La mayor parte de los costos operativos de una granja de camarón (40-60%) es generada por el alimento, por lo que el grado de atención y control que se tenga en este rubro es determinante en la definición de márgenes de utilidad y competitividad de esta industria.

Es así que una línea actual en las investigaciones en acuicultura se ha venido centrando en el estudio de los factores que permitan la formulación y elaboración de alimentos más eficientes que optimicen la eficiencia productiva y minimicen la pérdida de nutrientes en las heces y que puedan significar un ahorro en los costos de producción.

Partiendo del principio que "la producción de alimentos balanceados de calidad comienza con la selección de ingredientes de calidad", un factor determinante es el avance en desarrollo de técnicas de evaluación nutricional que permitan caracterizar, de una manera cada vez más precisa, química y nutricionalmente los ingredientes que se van a usar en la formulación.

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.

Aunque existen metodologías oficiales, como la reportada por la AOAC (1990), donde la enzima usada es la pepsina y la determinación se fundamenta en el grado de solubilización de la proteína expuesta a esta enzima, no hay evidencias de que esta metodología presente una buena correlación con la digestibilidad *in vivo* en camarones, especialmente considerando que estos organismos no presentan esta enzima en su tracto digestivo. Por otro lado, existen publicaciones de diversos autores (Carrillo, 1994., Lazo, 1994., Ezquerro, 1997b), que han desarrollado nuevas metodologías *in vitro* con enzimas de los propios camarones, pero ninguna de ellas se ha oficializado por falta de correlación con los resultados *in vivo* o por la necesidad de adquirir equipo especializado para aplicar la técnica, o por que solo se pueden aplicar para determinar digestibilidad proteica de ingredientes y no de alimentos compuestos por una mezcla de los mismos.

Así pues, 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, 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.

Adicionalmente, en función de los resultados obtenidos, se propusieron y evaluaron 2 nuevas metodologías, basadas en modificaciones de las ya existentes, en términos de sensibilidad, reproducibilidad y correlación con la respuesta en vivo, usando los mismos sustratos antes mencionados.

Finalmente, es importante mencionar que este estudio corresponde, de manera parcial, a uno de los objetivos planteados en un proyecto internacional financiado por la Comunidad Europea y por CONACYT sobre "la calidad de harinas de pescado necesaria para nutrición de camarón". Objetivo en el que se planteaba la necesidad de desarrollar un método de digestibilidad proteica *in vitro* lo suficientemente sensible para mostrar diferencias mínimas en calidad de harina de pescado, ingrediente proteico que puede presentar una calidad muy variable, pero que sigue siendo el mas utilizado en la fabricación de alimentos balanceados para acuicultura a nivel mundial, y que, en el caso particular de la elaboración de alimentos balanceados para camarones, es incluido en niveles hasta de un 30%, representando uno de los insumos mas costosos de la formulación.

2 ANTECEDENTES

2.1 Calidad de las proteínas y las harinas de pescado.

La proteína es uno de los componentes más estudiados e importante de las dietas para camarón debido al costo de los ingredientes proteicos y al alto requerimiento nutricional de estos organismos (30 - 60 %), en comparación con los requerimientos de los animales terrestres (12-25%) (Tacon, 1989). Por ello la productividad en la camaronicultura esta íntimamente ligada a la disponibilidad y costo de la proteína (Cruz Suárez, 1990).

Para disminuir el costo de la proteína en dietas comerciales es necesario optimizar el balance proteína/energía y de esta manera garantizar el crecimiento del organismo a un precio razonable. La proteína en las dietas se puede optimizar en términos de calidad y cantidad; la energía puede mejorar manipulando la proporción y la calidad de las fuentes de lípidos y carbohidratos.

Los camarones, en contraste con los organismos terrestres, son capaces de derivar mas energía metabolizable del catabolismo proteico que del metabolismo de carbohidratos (Cruz Suárez, 1988). La proteína de la dieta es hidrolizada en aminoácidos que serán utilizados con varios fines como son: construcción de nuevas proteínas funcionales y estructurales, mantenimiento, reparación de tejidos y crecimiento, además de servir como sustrato para la

formación de carbohidratos y lípidos y para el catabolismo generador de energía. Cruz Suárez (1990a), menciona que se requiere incorporar a las dietas ingredientes con contenido proteico en cantidad adecuada puesto que una vez cubierta la ración de mantenimiento, existe una relación directa casi lineal entre la ración proteica y la tasa de crecimiento, hasta llegar al requerimiento proteico (punto de máximo crecimiento), a partir del cual aunque se agregue más proteína el crecimiento no aumenta.

La calidad proteica es un factor que amerita una consideración especial al momento de establecer una concentración óptima de proteína en la dieta para lograr un máximo crecimiento. Esta calidad viene definida básicamente, por su digestibilidad y contenido en aminoácidos esenciales (De la Higuera, 1987).

La harina de pescado se considera como la fuente de proteína de mayor interés en alimentos balanceados para peces y crustáceos, ya que hasta la fecha no se han encontrado otras fuentes de proteína que presentes las características nutritivas para poder sustituir totalmente a la harina de pescado (Chavez, 1991). Dichas características nutritivas son: su poder attractante, su alta digestibilidad, su contenido de energía y ácidos grasos esenciales, su adecuado balance de aminoácidos particularmente lisina y aminoácidos azufrados, sus aportes en selenio, calcio, fósforo, siendo también una buena fuente de colina (Abdo, 1994). Así mismo cabe mencionar que varios autores (Barlow y Windsor, 1984; Castro, 1990; Akiyama *et al*; 1991) reportan que contienen factores desconocidos de crecimiento. Una de las principales ventajas que se obtienen al incorporar la harina de pescado en dietas balanceadas es que cubre cualquier deficiencia en aminoácidos de las proteínas de origen vegetal (Barlow *et al*, 1984; Cruz Suárez, 1990b).

Es por todos estos beneficios que el cuidar la calidad de la harina de pescado es un factor muy importante, sin embargo en México tanto la calidad como la disponibilidad de las harinas es un factor poco controlado y se ha detectado como un problema grave en la industria de los alimentos. Por lo tanto se requiere de estudios que nos ayuden a determinar la calidad de las mismas minimizando así esta limitante.

Son varios los factores que determinan la calidad de las harinas de pescado y dentro de los principales se encuentran los niveles de proteína, grasa, humedad, sal, arena peróxidos, ácidos grasos libres, aminoácidos, lisina disponible y la digestibilidad (Windsor y Barlow, 1984).

Pike y Hardy (1992) mencionan que la calidad de la harina de pescado se puede ver afectada por 5 factores principales como son:

- 1) Tipo de materia prima (especie, pescado entero o subproducto)
- 2) Frescura de la materia prima
- 3) Temperatura de secado y tiempo de permanencia en el secador
- 4) Calidad de lípidos

5) Calidad microbiológica

El grado de frescura de la materia prima cumple un rol primordial en la calidad de la harina de pescado, por esta razón es importante tener en cuenta el proceso de deterioro que se produce en el pescado durante el período de almacenamiento, previo a su procesamiento (Castro, 1990). La frescura de la materia prima se mide habitualmente determinando el contenido de Nitrógeno Volátil Total (TVN) de la materia prima, el cual debe estar por debajo de 90 mg N por 100 g de pescado (Pike *et al.* 1990), aunque existen otros parámetros indicativos de la frescura como son el contenido de aminas biogénicas.

El daño a la calidad nutricional de las proteínas se encuentra en relación directa con la temperatura y el tiempo durante el que son expuestas a la misma. El efecto de la temperatura no radica únicamente en la destrucción de los aminoácidos constitutivos, sino que implica también su conjugación con otros compuestos, lo que provoca que su biodisponibilidad disminuya (v.g reacción de Maillard). El sobrecalentamiento puede llegar a afectar drásticamente la composición química del ingrediente en cuestión propiciando la formación de sustancias deletéreas o tóxicas (Balconi, sin año; Castro, 1990). Un ejemplo de esto lo señalan Morales *et al.* (1991), quienes mencionan que al momento de sobrecalentar la harina de pescado la histamina que forma parte de las moléculas solubles del pescado (producto de la decarboxilación de la histidina) reacciona con la lisina, y se forma la mollerósina que es causante del vómito negro en aves.

Un bajo contenido de agua hace a la harina más estable frente a posibles alteraciones por bacterias y enzimas. Al no estar bien desecada se propicia la proliferación de microorganismos y con ello se reduce el valor nutritivo del producto. Windsor y Barlow (1984) indican que al utilizar deshidratadores directos o indirectos (los cuales funcionan a base de alta temperatura) para disminuir la humedad en las harinas de pescado, se corre el riesgo de que en el caso de una deshidratación excesiva (<8% de humedad) se reduzca el valor nutritivo de estas.

Existen evidencias que indican que la temperatura a la que es procesada la harina de pescado, puede ser fundamental en términos de digestibilidad, cuando ésta se usa en dietas para salmónidos. Por ello en Noruega se ha optado por producir una harina de pescado a baja temperatura (Norse-LT94^R) con una materia prima muy fresca, la cual tiene un TVN < 50 mg por 100 g de pescado (Pike *et al.* 1990).

Las grasas son dañadas por el proceso de oxidación, y las consecuencias de este fenómeno son:

- * Generación de calor que puede resultar en auto combustión, disminución en el contenido de grasa y el valor energético.
- * Producción de radicales libres (peróxidos) los cuales aceleran la oxidación y no tienen valor nutricional e incluso resultan dañinos.
- * Formación de polímeros sin valor nutricional.
- * Destrucción parcial o total de vitaminas liposolubles y algunas del complejo B.

- * Disminución de la calidad de la proteína cruda y de ciertos aminoácidos (Balconi, sin año).

Para prevenir el fenómeno de oxidación es recomendable la utilización de antioxidantes. En harinas en las cuales no se ha utilizado antioxidantes, es posible que por su contenido de ácidos grasos insaturados y debido al proceso de oxidación donde se produce calor, se favorezca la formación de mollosina (Morales *et al.* 1991). Además este calentamiento de las proteínas durante el proceso de oxidación de los lípidos, puede reducir la digestibilidad de los aminoácidos (Pike *et al.* 1990).

2.2 Importancia de la determinación de la digestibilidad.

En las plantas de fabricación de alimentos, se requiere tomar decisiones rápidas, al momento de recepción y compra de materias primas, al formular y durante el control de calidad del producto final. Para ello, existen métodos de control químicos, biológicos y microbiológicos. Dentro de los químicos se encuentran los métodos de digestibilidad *in vitro* y en los biológicos los métodos de digestibilidad *in vivo*.

Carrillo (1994), menciona que todas estas técnicas están dirigidas fundamentalmente, a conocer tres características de los ingredientes que son:

- * Composición química
- * Biodisponibilidad de nutrientes
- * Digestibilidad

En 1970 la IAFMM reporta que la digestión incompleta puede ser la principal o única causa probable que se encuentra al origen de la falta de disponibilidad de los aminoácidos, y como sabemos aún cuando un alimento tiene un adecuado balance de aminoácidos, éste resulta de poco valor si los nutrientes no están disponibles. Por otra parte es importante considerar que en formulaciones completas para animales existen efectos asociativos de los ingredientes y que estos pueden ser positivos (incrementando la disponibilidad del nutriente), o negativos (disminuyéndola). Estos efectos pueden ser determinados por cambios en la digestibilidad del ingrediente o de algún componente específico del ingrediente (Brown *et al.* 1989).

La determinación de la digestibilidad es esencial no solo para formular dietas a bajo costo sino que además es muy útil para la investigación de requerimientos nutricionales, selección de ingredientes con valor nutritivo potencial (en relación con la calidad de la materia prima), y formulación de dietas que minimicen la contaminación del agua (Brown, 1989; Akiyama *et al.* 1991; Hagen *et al.* 1993a; Mendoza, 1993; Romero y Manrique, 1993). El uso de los datos de digestibilidad de un ingrediente es esencial para la formulación de una dieta con un bajo índice de contaminación sin riesgo para el medioambiente (Lee y Lawrence, 1997).

Los experimentos de alimentación o determinación de la digestibilidad aparente *in vivo* han sido los métodos mas utilizados para determinar el valor nutritivo de las dietas o ingredientes

de la mismas. Aunque estos métodos son buenos, son métodos muy laboriosos y costosos que además requieren de mucho tiempo para la obtención de resultados (Lan and Pan, 1992).

La determinación de la digestibilidad *in vivo* en organismos acuáticas es todavía mas difícil ya que la colecta de las heces es muy laboriosa y tardada en organismos de talla pequeña como los camarones además, trae consigo problemas específicos de sobreestimación (por lixiviación de las heces al estar en el agua) o subestimación (por estrés cuando se saca a los organismos del agua) (Choubert et al 1982). Es por ello que se ha utilizado la determinación de la digestibilidad en otras especies en las que es mas fácil y rápida la colecta de heces (ej. organismos terrestres como el mink o peces de mayor tamaño como la trucha y el salmón), para establecer diferencias de calidad en ingredientes o dietas utilizadas en la alimentación de camarones, sin embargo no se ha establecido la correlación con la digestibilidad en estos últimos.

Por lo tanto, ante la necesidad de contar con técnicas rápidas y poco onerosas para la determinación de la digestibilidad proteica, se han desarrollado un cierto número de métodos *in vitro*, que permiten llevar a cabo en menor tiempo y de manera eficaz la selección de diferentes lotes de materia prima y el monitoreo de diferentes procesos de transformación de los alimentos (Moughan *et al.* 1989).

Hsu *et al.* (1977), indican que, al seleccionar el método más adecuado para la determinación de la digestibilidad *in vitro*, se debe de tener en cuenta las siguientes características: el método debe ser simple y rápido, arrojar resultados reproducibles, poseer una alta correlación con algún método *in vivo*, y ser lo suficientemente sensible para detectar los efectos debido al procesamiento.

2.3 Digestibilidad *in vitro*

Anderson *et al.* (1993) indican que las evaluaciones biológicas son los métodos más adecuados para medir la calidad total de un ingrediente, ya que en las determinaciones *in vitro* se llevan a cabo reacciones más drásticas que aquellas que ocurren durante la digestión natural de los organismos y se liberan nutrientes que de otra manera no estarían disponibles y por lo tanto normalmente no describen bien la calidad de un ingrediente.

Las diferencias encontradas entre los resultados de los métodos de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* pueden ser debidas a que *in vivo* se presentan una serie de factores que son muy difíciles de simular en los métodos *in vitro*, por ejemplo: el pH exacto al que ocurre la digestión, la actividad microbiana existente en el tracto intestinal del organismo, los movimientos mecánicos del estómago e intestino, factores medioambientales que contribuyen al estrés, estado fisiológico y edad del organismo en el cual se efectúa el estudio, la presencia de factores antinutricionales que no pueden ser determinados por los métodos de digestibilidad *in vitro* (Van Wormhoudt, 1980; Mendoza, 1994; Lee y Lawrence, 1997), incluso los métodos utilizados para la colecta de las heces, el tipo de marcador utilizado, la pérdida de nutrientes de las heces o del alimento, etc. (Leavitt, 1981; Coelho, 1984). Además hay que tener en cuenta que en algunos de los métodos *in vitro*, se utilizan enzimas heterologas (AOAC, 1990; Hsu *et al.* 1977; Saterlee *et al.* 1979) y en algunos casos se emplean sistemas uni-enzimáticos (AOAC, 1990; Lazo, 1994) y no multi-enzimáticos como ocurre *in vivo*,

por lo que los métodos *in vivo* resultan más sensibles para diferenciar entre dos digestibilidades muy parecidas.

Sin embargo, el hecho de que *in vivo* sean tantos los factores que pueden hacer variar las determinaciones, hace aun mas difícil el poder comparar los resultados entre laboratorios, por lo que el establecimiento de una técnica común en todos estos centros sería una herramienta muy útil para poder determinar la calidad de los ingredientes y seleccionar ingredientes potencialmente útiles.

Entre los métodos que miden la digestibilidad *in vitro*, los que determinan la digestibilidad proteica son los mas comúnmente utilizados, debido a que las proteasas son las enzimas mas activas y a que comercialmente existen análogas de vertebrados. Todos estos métodos difieren fundamentalmente en las enzimas proteolíticas utilizadas, condiciones de digestión (pH, temperatura, tiempo de hidrólisis) y formas de comprobar la digestión de las proteínas.

En 1994 Carrillo realizó un resumen de los métodos comúnmente empleadas con el fin de determinar la digestibilidad *in vitro* (Tabla.-1). Sin embargo en su recapitulación no menciona la modificación a la técnica de digestibilidad con pepsina que propone la "Estación de Investigaciones Torry" la cual es una modificación a la metodología propuesta por la A.O.A.C. en 1990.

Los estudios de las enzimas digestivas del hepatopáncreas de algunos crustáceos (Lee *et al.*, 1980; Galgani, 1983; Galgani *et al.* 1983;) indican que las principales enzimas digestivas son:

- Tripsina
- Quimiotripsina
- Carboxipeptidasa A y B
- Leucina-aminopeptidasa
- Colagenasa
- Proteasa alcalina de bajo peso molecular
- Enzimas bacteriolíticas
- di y tri-peptidasas

De lo antes visto, hay que resaltar la ausencia de pepsina y considerar que los camarones a diferencia de los vertebrados, no tienen estómago verdadero, además de no poseer células secretoras de ácido, por lo que su digestión se lleva a cabo en un pH básico o neutro (con pH's óptimos que fluctúan desde 6 hasta 11). La ausencia de sistema ácido de digestión es compensando por la gran capacidad de reducción mecánica de los ingredientes por medio del molino gástrico (Glass *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1984).

Otro punto importante de mencionar es que la tripsina es la principal proteasa digestiva, constituyendo hasta 6.1% de las proteínas solubles del hepatopáncreas, y lleva a cabo del 40 al 50% de la proteólisis digestiva total. Por otra parte, a diferencia de la tripsina de los vertebrados, la tripsina de los crustáceos tiene la capacidad de atacar a proteínas desnaturalizadas pero, al igual que la de estos, es sensible al inhibidor trípico de la soya (Galgani *et al.*, 1985), además esta enzima

presenta varias iso-enzimas (Galgani, 1983; Le Moullac, 1994, Van Wormhoudt, 1980; García-Carreño, 1999).

Tabla 1.- Comparación de algunos métodos para determinar la digestibilidad *in vitro* de proteínas (tomado de Carrillo, 1994).

Enzimas	Duración de la hidrólisis	Control de la Hidrólisis	Referencia
Pepsina Pancreatina Tripsina Erepsina	96 horas	Aminoácidos	Turi, Virchow y Loughlin, 1956.
Pepsina Pancreatina	3-27 horas	Aminoácidos	Akeson y Stahmann, 1964.
Pepsina Contenido intestinal de cerdo	4 - 8 horas	Nitrógeno	Furuya, Sakamoto y Takahashi, 1979.
Tripsina Qimiotripsina Peptidasas	10 minutos	Disminución del pH	Hsu <i>et al.</i> 1977.
Pancreatina	2 - 48 horas	Nitrógeno alfa-amino	Schroeder, Jacobellis y Smith, 1961.
Tripsina	2 horas	Proteína soluble (D.O.a 280 nm)	Deshpande y Nielsen, 1987.
Pepsina Polvo de páncreas y duodeno	3 - 72 horas	Nitrógeno alfa-amino	Denton y Elvehjem, 1953.
Contenido intestinal de salmón	11,5 horas	Aminoácidos y péptidos	Grabner, 1985.
Homogenado de hepatopáncreas de camarón	4 horas	Proteína soluble (D.O.a 280 nm)	Lan y Pan, 1993.

2.4 Estudios de digestibilidad *in vitro*.

Diversos métodos *in vitro* basados en la digestibilidad de las proteínas empleando proteinasas han sido desarrollados. Sin embargo la mayoría han sido establecidos para peces u otras especies, y en algunos de los que se desarrollaron para camarón no se ha establecido su correlación con la digestibilidad *in vivo* ni la sensibilidad de las técnicas para detectar diferencias de calidad.

Grabner (1985) determina un 94.6 % de digestibilidad en una proteína proveniente de una bacteria después de una incubación *in vitro* con un extracto enzimático de *Salmo gardneri* y lo compara con el 93.5% obtenido en un bioensayo de digestibilidad aparente. Aunque este método utiliza las enzimas provenientes de la misma especie y trata de simular las condiciones del ensayo *in vivo*, tiene la desventaja de que no determina su correlación con la digestión *in vivo* y además no se determina la sensibilidad del mismo.

Eid y Matty (1989) evalúan la digestibilidad *in vitro*, con el método de pH drop (estimación indirecta de digestibilidad midiendo la disminución de pH), en diferentes proteínas utilizando extractos intestinales de carpa, y obtienen una alta correlación entre métodos *in vivo* e *in vitro*. Este método tiene la desventaja de que si la muestra contiene mucha grasa la liberación de ácidos grasos durante la digestión interfiere con la caída del pH, además de que la caída del pH hace a las enzimas menos eficientes lo cual va en detrimento de la sencibilidad.

Lan y Pan (1993), trabajando con *Penaeus monodon*, determinan la digestibilidad *in vitro* de diferentes proteínas utilizando como enzima extractos de la glándula del intestino medio del organismo, su método consiste en determinar la proteína soluble (A_{280nm}) a pH 7.5 por 4 horas o en dos etapas una a pH 7.5 por 2 h. y a pH 4 por 2 h , obteniendo una correlación alta entre sus resultados y la cantidad de lisina y arginina disponible ($r=0.99$). Sin embargo no obtienen la correlación con la digestibilidad *in vivo*.

Anderson *et al.* (1993), evalúan harinas de pescado de diferente calidad para el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y utilizan el método de digestibilidad *in vitro* con pepsina corregida por la solubilidad de la proteína en ácido descrita por el A.O.A.C., utilizando una solución de 0.2% de pepsina y la modificación de este método descrita por el laboratorio de Torry utilizando una solución de pepsina al 0.0002%, así mismo utilizan el método multi-enzimático de pH-Stat (estimación indirecta de la digestibilidad midiendo la cantidad de NaOH necesaria para mantener el pH constante) descrito por Pedersen y Eggum (1983) y encuentran que el método del AOAC no es sensible a las diferencias de calidad de las harinas y que no se correlaciona con los métodos *in vivo*, el método Torry modificado y el pH-Stat se correlacionan bien con la digestibilidad *in vivo* y son sensibles a las diferencias de calidad de la proteína. Es por ello que estos métodos se podrían utilizar en camarón, sin embargo como se mencionó anteriormente este organismo carece de pepsina y de digestión ácida.

Dimes y Haard (1994), desarrollaron un método para estimar la digestibilidad *in vitro* en salmones utilizando fracciones enzimáticas de la ceca pilórica del pez, observando que su método se correlaciona con la digestibilidad *in vivo* y con el método de pH-drop. Además indican que este método es mejor que el pH-drop para determinar el rango de disponibilidad proteica y también

estima la digestibilidad de diferentes fuentes alternas de proteína, por lo que es un método muy prometedor para ser evaluado en camarón, sin embargo mencionan que no puede ser utilizado para alimentos que han sido parcialmente hidrolizados durante su procesamiento.

En 1994, Carrillo propone la utilización de un producto obtenido del hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* nombrado "Hepatopancreatina", utilizando la técnica propuesta por Furuya, Sakamoto y Takahashi en 1979; donde se realiza la determinación de la digestibilidad proteica *in vitro* de ingredientes empleados comúnmente en dietas para camarón, obteniendo una correlación significativa con la ganancia en peso de juveniles de camarón alimentados con dietas que contenían esas fuentes proteicas. Este trabajo posee también la desventaja de no mostrar si existe o no la correlación con la digestibilidad *in vivo*.

Lazo (1994) evalúa la calidad de algunas harinas de pescado Chilenas utilizando el método *in vitro* de caída de pH (pH-Drop), empleando enzimas proteolíticas comerciales, comparando los resultados con otros parámetros químicos y biológicos. El ensayo, utilizando tripsina porcina, tuvo una correlación significativa con algunos parámetros como T.V.N., digestibilidad con pepsina y contenido de histamina, y obtuvo con esta técnica además la capacidad de diferenciar las harinas de pescado de diferente calificación biotóxica. Sin embargo estudios posteriores demostraron que la digestibilidad *in vivo* de las harinas de pescado no está ligada a la calificación biotóxica (Nieto López, 1995; Tapia Salazar, 1996; Cruz Suárez *et al.* 1996).

Ezquerria *et al.* (1997) emplean el método de pH-Stat para evaluar la digestibilidad proteica de harinas de diferentes ingredientes y encuentran que el grado de hidrólisis de las 7 harinas evaluadas se correlaciona mejor con la digestibilidad aparente *in vivo* cuando utilizan como sistema enzimático los extractos provenientes del hepatopáncreas de camarón ($r^2=0.73$), comparado con el sistema de 4 enzimas comerciales ($r^2=0.71$), así mismo, encuentra una mejor correlación con la digestibilidad aparente *in vivo* al utilizar enzimas del hepatopáncreas con el método de pH-Stat que con el de pH-Drop ($r^2=0.55$). Su desventaja es que no determinan si el método es sensible a las diferencias de calidad de harinas de un mismo origen (ej. harinas de pescado).

Ninguno de los métodos anteriormente mencionados permite a la vez, cubrir las necesidades de la industria de, determinar la digestibilidad proteica tanto de alimentos terminados como de ingredientes que presentan pequeñas variaciones en digestibilidad por factores de condiciones de proceso (calidades de harinas de soya, pescado, etc.), por carecer de sensibilidad, de sencillez y alta correlación con la digestibilidad *in vivo*.

3 IMPORTANCIA

Siendo la harina de pescado un ingrediente indispensable para las dietas comerciales formuladas para el camarón, y considerando su costo y su alta variabilidad, el presente estudio posee una gran importancia desde el punto de vista práctico y económico; está enfocado a establecer un método de digestibilidad *in vitro* que sea rápida, sencilla, económica y altamente sensible que pueda ser utilizada para evaluar la calidad tanto de harinas de pescado como de alimentos para camarón.

La selección de ingredientes de calidad es necesaria para la obtención de alimentos balanceados de calidad. La determinación de la digestibilidad *in vitro* de los ingredientes que se utilizan en formulación de alimentos para camarón, en especial de harinas de pescado, aun adolece de estandarización y validación clara con resultados obtenidos *in vivo*. Con el presente trabajo se pretende contribuir en la selección o el desarrollo de una técnica adecuada que presente una buena correlación con la digestibilidad *in vivo*. Esta técnica permitirá clasificar rápidamente por su valor nutricional, harinas de pescado, otros ingredientes y alimentos terminados en laboratorios de control de calidad de la industria de alimentos balanceados para camarón.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la correlación de la digestibilidad *in vivo* en camarón 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, 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.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

A).- Evaluar la sensibilidad de *Litopenaeus vannamei*, en términos de digestibilidad proteica *in vivo*, para diferenciar la calidad nutricional de diferentes harinas de pescado y su correlación con otros parámetros de calidad (contenido de nutrientes y solubilidad de la proteína) y con la digestibilidad en otras especies.

B).- Determinar la sensibilidad del método de pH-Stat propuesto por Ezquerro *et al.* (1997), para evaluar la calidad nutricional de las harinas de pescado y alimentos para camarón y su correlación con la digestibilidad *in vivo*.

C).- Determinar la sensibilidad del método del A.O.A.C. modificado por el laboratorio de Torry, para evaluar la calidad nutricional de las harinas de pescado y alimentos para camarón y su correlación con la digestibilidad *in vivo*.

D).- Establecer una técnica de determinación de la digestibilidad proteica *in vitro* (tipo AOAC) altamente sensible y correlacionada con la digestibilidad *in vivo*, utilizando enzimas provenientes del hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* o tripsina bovina.

E).- Determinar si la técnica propuesta puede ser utilizada en otros ingredientes y en *L. stylirostris*.

6 ORIGINALIDAD

Actualmente no existe una técnica de determinación de la digestibilidad proteica *in vitro* que sea suficientemente sensible para detectar diferencias de calidad en las harinas de pescado ocasionadas por el procesamiento y que además posea una alta correlación con la digestibilidad proteica *in vivo* en camarón. Además, no existe ningún estudio de digestibilidad *in vitro* en donde se evalúen alimentos para camarón y los que existen para peces no han obtenido buenas correlaciones con la digestibilidad *in vivo*. Por otro lado la técnica mas prometedora (pH-stat con enzimas de camarón) resulta ser muy difícil y costosa.

El presente estudio pretende establecer una técnica de determinación de la digestibilidad *in vitro* utilizando enzimas obtenidas a partir de hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* o tripsina bovina, que pueda ser utilizada tanto en ingredientes como en alimentos, y que no requiera de equipo muy sofisticado para que pueda transferirse a la industria de alimentos rápidamente.

7 HIPÓTESIS

El método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con pepsina, modificado para la utilización de un homogeneizado enzimático obtenido del hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, permite diferenciar harinas de pescado y alimentos para camarón que presentan digestibilidades muy cercanas, y posee una alta correlación con la digestibilidad aparente *in vivo* de las mismas. Además puede ser utilizado para otros ingredientes y en otras especies de pendidos (*L. stylirostris*).

8 MATERIAL Y MÉTODO

Para el desarrollo del método de digestibilidad *in vitro* con enzimas de *Litopenaeus vannamei*, se eligió como modelo la técnica oficial propuesta por la AOAC en 1990 modificada por el laboratorio de Torry (Método de filtración con la determinación del material no solubilizado) por considerarse la más económica y fácil de aplicar en series de muestras numerosas.

Se obtuvieron harinas de pescado elaboradas bajo diferentes procesamientos o con diferente grado de frescura de la materia prima, lo cual presumiblemente afecta la digestibilidad de las

proteínas. Se determinó la digestibilidad *in vivo* de la proteína y de la materia seca de las harinas y de las dietas elaboradas con éstas. La determinación de la digestibilidad *in vivo* se utilizó para validar la digestibilidad *in vitro* obtenida con varios métodos:

- medición de la tasa inicial de hidrólisis con enzimas de camarón (método pH-Stat)
- medición de la disminución de Nitrógeno insoluble (método AOAC) con pepsina bovina diluida (método AOAC, Torry modificado) con tripsina bovina y finalmente con enzimas de camarón.

8.1 Determinación de la digestibilidad *in vivo*.

Se utilizó el método indirecto utilizando como marcador a el óxido de cromo y la técnica de colecta de heces por sifoneo (Cho y Slinger, 1979; Mendoza, 1994; Nieto-López, 1995).

8.1.1 Harinas de pescado experimentales

Para determinar la calidad nutricional de las harinas de pescado, se determinó la digestibilidad proteica *in vivo* de estas y de las dietas a las cuales fueron integradas. Se evaluaron 12 harinas de pescado y un concentrado proteico que fueron elaborados bajo diferentes procesos de secado y tres harinas elaboradas con materias primas de diferente frescura lo cual afecta también la digestibilidad.

Como se observa en la tabla 2, se contó con una harina elaborada a baja temperatura (539/93) lo cual es un proceso muy noble que no daña a la fracción proteica por lo que se supone que será una harina de excelente digestibilidad, pero también se contó con harinas como la 163/94 que fueron elaboradas con procesos mas drásticos de secado.

Las harinas fueron proporcionadas por el Dr. Ian Pike, director de nutrición de la Asociación Internacional de Productores de Harina y Aceite de Pescado (IFOMA por sus siglas en inglés), Londres, U.K., quien proporcionó también los valores de digestibilidad proteica *in vivo* de las harinas de pescado experimentales en mink (el cual es un mamífero terrestre por lo que es mas fácil y económico determinar su digestibilidad *in vivo* además de que la digestibilidad obtenida en este organismo ha sido utilizada como indicador indirecto para salmón) salmón y trucha; en estas dos especies de salmónidos, se determinó la digestibilidad en diferentes laboratorios y bajo diferentes métodos de colecta de heces. En la tabla 3, se muestra el resultado de estas determinaciones. Se observa que independientemente de la especie y técnica de colecta, la harina F815 es la que posee la mayor digestibilidad seguida por la 539/93, mientras la A3481 o la 163/94 poseen los resultados mas bajos.

Además de las harinas proporcionadas por el Dr. Pike se trabajó con una harina de pescado de excelente calidad que se uso como referencia; dicha harina fue elaborada a partir de Jurel y provenía de una empresa Chilena llamada TEPUAL.

La composición bromatológica de las harinas (Tabla 7) fue determinada en el laboratorio de maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas mediante los métodos propuestos por el

A.O.A.C. (1990), así como su digestibilidad con pepsina por el método modificado por el laboratorio de Torry.

Tabla 2.- Características de las harinas de pescado experimentales

Harina	Proteína cruda % BH	Tipo de pescado	TVN en pescado crudo mg/100 g	Harina entera (1) /torta de prensa	Tiempo de secado min	Eq Suppl. mg/kg	Secado (2)
F 815	74.80	Arenque ¹	<50		---	200	SCAC
539/93	74.20	Arenque ¹	<50	Torta de prensa	---	300	Baja temperatura (scv)
163/94	74.00	Arenque ¹	<90	Torta de prensa	---	300	Alta temperatura (scv)
CPSP	73.50	Lenguado ²	<50	Concentrado proteico de solubles de pescado	---	250	Espreado
F 813	73.00	Capelán ³	<50		---	200	SCAC
2204	72.10	Lanzones ⁴	40	Harina entera	180	150	SCV-PCD
Taf-1	72.10	Lanzones ⁴	50	Harina entera	165	500	SDV
11858	70.40	Desechos de Arenque ⁵	28.5	Harina entera	20	400	SCAC+SDR
1986	70.10*	---	---	---	---	---	---
Frcsea	69.6	Anchoveta ⁶	14	Harina entera	80	100	Baja temperatura (scv)
1431	69.20	Macarela ⁷	40	Harina entera	180	300	SCV-PCD
2002	68.43*	---	---	---	---	---	---
Moderad a	67.70	Anchoveta ⁶	30	Harina entera	80	100	Baja temperatura (scv)
Descomp uesta	65.80	Anchoveta ⁶	50	Harina entera	80	100	Baja temperatura (scv)
3664	64.20	Desecho de pescado blanco ⁸	22	Harina entera	90	50	scv
A 3481	63.60	Menhaden ⁹	---	Harina entera	20	625	---
Tepual *	70.5	Jurel ¹⁰	---	Harina entera	---	400	SDR

*Tepual (datos proporcionados por Inual-tepual, Santiago de Chile): humedad = 7.2%, proteína = 70.5, grasa = 8.4, ceniza = 14, arena = 0.1, cloruros = 2.3, FFA = 4.6, Histamina = 545 ppm., TVN = 105 mgN/100g

(1) Harina entera = Torta de prensa + solubles delipidados concentrados

(2) Secador con chaqueta de vapor = SCV; Secador con chaqueta de aire caliente = SCAC; Secador de disco rotativo = SDR; Secador de Disco con vacío = SDV.

1.- Arenque europeo (*Clupea harengus harengus*)

2.- Diversas especies de peces planos europeos (lenguados)

3.- Capelán (*Trisopterus minutus capelanus*)

4.- Lanzones europeos (*Hiperoplus lanceolatus* y *Ammodytes marinus*) (Sandeel en inglés = Tobis en danés)

5.- Desechos de Arenque

6.- Anchoveta (*Engraulis ringens*) procedente de Chile.

7.- Macarela del pacífico (*Scomber japonicus*) o del atlántico (*Scomber scombrus*)

8.- Desechos de pescado plano

9.- Menhaden (*Brevoortia tyrannus* y *B. Patronus*) procedente de E.U.A. atlántico.

10.- Jurel (*Trachurus symmetricus* o *japonicus*) procedente de Chile.

Tabla 3.- Resultados de digestibilidad aparente de la proteína en mink (proteína verdadera), salmón y trucha (digestibilidad aparente) de las harinas de pescado experimentales.

Proteína cruda % (Base húmeda)	Harina	Mink (%)	Trucha A (%)	Trucha B (%)	Salmon C (%)	Salmon D (%)	Salmon E (%)	Camarón UANL (%)
74.80	F 815	94.7	95.8	96.3	88.6	89.5	90.5	91.02
74.20	539/93	92.5	95.6	95.2	88.3	89	90.7	88.22
74.00	163/94	83.9	94.7	89.7	77.4	76.3	79.5	75.84
73.50	CPSP	----	97.9	97.3	88.3	89	89.8	98.74
73.00	F 813	83.4	87.1	93.3	83.9	86.2	84.4	95.98
72.10	2204	89	89.6	92.2	79.1	82.9	84.5	79.82
72.10	Taf-1	91.6	95.3	93.9	85.9	87.5	88.8	87.47
70.40	11858	92.4	90.7	92	83.9	85.5	85.5	86.46
70.10	1986	88.2	95.9	94.6	85.5	85.7	85.4	81.21
69.6	Fresca	91.4	---	---	---	---	---	85.55
69.20	1431	87	92.4	92.2	83.7	83.7	86.5	92.20
68.43	2002	86.2	96.3	93.7	85.2	86.1	89.4	82.61
67.70	Moderada	89.7	---	---	---	---	---	86.49
65.80	Descomp uesta	89.8	---	---	---	---	---	88.96
64.20	3664	85.1	95.7	94.4	84.3	87	89.9	83.71
63.60	A 3481	83.1	88	87.9	76.2	80.6	83.1	85.27
	Max.	94.7	97.9	97.3	88.6	89.5	90.7	98.7
	Min	83.1	87.1	87.9	76.2	76.3	79.5	75.8
	Rango	11.6	10.8	9.4	12.4	13.2	11.2	22.9

Trucha A.- Colecta de heces por sedimentación, Washington

Trucha B.- Colecta de heces por masaje abdominal, Fundación Chile

Salmón C.- Colecta de heces por masaje abdominal, Instituto para Acuicultura. Sunndaisora, Noruega.

Salmón D.- Colecta de heces por masaje abdominal, ARC- Nutreco

Salmón E.- Colecta de heces por sedimentación ARC- Nutreco

UANL – Colecta de heces por sifoneo

8.1.2 Dietas experimentales

8.1.2.1 Formulación y composición de las dietas.

Con la harina de pescado TEPUAL, se formuló una dieta de referencia por medio de un programa computacional Mixit-2, en función del análisis bromatológico de la harina de pescado y de los demás ingredientes que la constituyen, para obtener una dieta que cumpliera con los requerimientos nutricionales publicados para camarón por Akiyama *et al.* (1991) (Tabla 4).

Con las harinas experimentales, se elaboraron 16 dietas que contenían 30 % de cada una de las harinas experimentales y 70 % de la dieta de referencia para determinar la digestibilidad

aparente *in vivo* tanto de las dietas como de las harinas de pescado siguiendo el sistema propuesto por Cho *et al.* (1979) en el cual la digestibilidad se determina según las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de digestibilidad} = \left[1 - \left(\left(\frac{\% \text{ proteina en heces}}{\% \text{ proteina en dieta}} \right) \times \left(\frac{\% \text{ cromo en dieta}}{\% \text{ cromo en heces}} \right) \right) \right] \times 100$$

$$\% \text{ Digest. ingrediente} = \left(\frac{(\text{Dig. D.E.} \times \% \text{ prot. D.E.}) - (70 \times \text{Dig. D.R.} \times \% \text{ prot. D.R.})}{0.3 \times \% \text{ Prot. en el Ingrediente}} \right)$$

Donde D.E.= Dieta experimental y D.R.= Dieta de referencia.

Tabla 4.- Composición de las dietas del bioensayo de digestibilidad *in vivo*.

INGREDIENTE	D.R. (%)	D. E. (%)
H. P. EXPERIMENTAL	---	30
H. DE PESCADO (TEPUAL)	16	11.2
COLESTEROL SOLVAY	0.174	0.1218
ATRACTANTE (Flavorpacke INVE)	0.5	0.35
MEZCLA MINERAL	0.25	0.175
MEZCLA VITAMINICA	0.25	0.175
H. CAMARON (TEPUAL)	4	2.8
PASTA DE SOYA	16	11.2
ACEITE DE PESCADO	2.445	1.7115
LECITINA DE SOYA	2.818	1.9726
ANTIOXIDANTE (ETQ)	0.02	0.014
HARINA DE TRIGO	39.859	27.9013
GLUTEN DE TRIGO	6	4.2
METIONINA	0.177	0.1239
MONOFOSFATO DE Na. Cr ₂ O ₃	10.508	7.3556
	1	1

D.R. = Dieta de referencia, D.E. = Dieta experimental

8.1.2.2 Preparación de las dietas.

Se molieron todos los ingredientes en un molino de café Moulinex y se pesaron conforme a lo indicado en la fórmula, para mezclarlos posteriormente en una batidora Kitchen Aid de 5 lt. Primeramente se mezclaron los ingredientes de mayor proporción en la fórmula, hasta obtener una mezcla homogénea de la cual se tomo una pequeña porción para añadir las vitaminas y el Cr₂O₃, la cual fue agregada de nuevo a la mezcla total. La lecitina y el aceite de pescado se mezclaron por separado y se añadieron lentamente a la mezcla de harinas, finalmente se agrego agua.

Para obtener los pellets se utilizó un molino de carne Torrey con un cedazo de 2 mm. de diámetro, alcanzando el alimento una temperatura máxima de 75°C al salir del barril del molino tardándose en promedio 30 min en pasar 1kg de dieta; estos pellets obtenidos se secaron a 50°C durante 12 hrs. o a 100°C por 8 min y se conservaron en refrigeración a 4°C dentro de recipientes herméticos.

8.1.2.3 Análisis de lixiviación de la dieta.

Para determinar la estabilidad y el porcentaje de pérdida de materia seca del alimento se realizaron los análisis de lixiviación como se describe a continuación:

Se utilizaron canastas de tela metálica con una luz de malla de 1 mm. las cuales fueron previamente secadas en la estufa a 100°C durante 8 hrs. y dentro de ellas se colocaron 10 g de alimento, posteriormente se introdujeron en un recipiente que contenía agua marina (35 ppt) a una temperatura de 30°C durante una hr. Estas canastas se colocaron en un eje conectado a un motor que le confería un movimiento circulatorio de 5 r.p.m. Al final de esta fase, las canastas con el alimento lixiviado se colocaron nuevamente en la estufa, para después ser pesadas, y así evaluar la pérdida de materia seca conforme a la siguiente fórmula.

$$\text{Pérdida de materia seca} = \frac{(P1 - Pc) \times MS - (P2 - Pc)}{(P1 - Pc) \times MS} \times 100$$

Donde: P1= peso canasta + alimento.

Pc = peso canasta seca.

MS = relación peso materia seca/ peso del alimento.

P2= peso canasta + alimento lixiviado seco.

Los valores obtenidos de lixiviación de las dietas, se utilizaron posteriormente para corregir los valores de digestibilidad aparente por las pérdidas de materia seca del alimento antes de ser ingerido de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \%DAMS \text{ lixcorr.} &= \left[1 - \left(\frac{Cr. \text{ dieta}}{Cr. \text{ heces}} \times \frac{1}{(1 - PMS/100)} \right) \right] \times 100 \\ \%DAP \text{ lixcorr.} &= 100 \left(1 - \left\{ \frac{Prot. \text{ heces}}{Prot. \text{ dieta}} \times \frac{Cr. \text{ dieta}}{Cr. \text{ heces}} \times \frac{1}{1 - PP/100} \right\} \right) \end{aligned}$$

Donde: %PMS = Pérdida de materia seca

% PP = Pérdida de proteína de la dieta después de lixiviar.

Para la realización de los bioensayos se siguió el protocolo que a continuación se describe:

Aclimatación: Los camarones se alimentaron con una dieta base sin harina de pescado que contenía 1% de óxido de cromo, durante 3 días.

Ayuno: El 4^o día no se alimentaron con el fin de eliminar el alimento de base del tracto digestivo.

Recolección de heces: El 5º día se alimentaron los organismos con el alimento marcado, el cual contenía 30% de una harina experimental y 70% de inclusión de la dieta de referencia, este fue el primer día de recolección de heces. Las excretas fueron colectadas bajo el método de sifoneo, ya que este ha proDescompuestao ser la mejor técnica de colecta en las condiciones de la sala de zootecnia donde se realizó el bioensayo (Nieto *et al.* 1995). La colecta se llevó a cabo en acuarios rectangulares de fibra de vidrio de 20 x 30 x 20 cm. de 10 lt de capacidad, los cuales contaban con una aireación constante que permitía la oxigenación y recirculación interna del agua, el recambio de agua se realizo en forma manual (100 % a las 8 A.M. y 50 % a la 1 P.M.).

El alimento fue distribuido en 2 raciones diarias (a las 9.00 A.M. y 1.00 P.M.), para sumar el 10% de la biomasa del acuario. Los camarones se alimentaron durante una hora para eliminar después los restos de alimento y proceder posteriormente con la colecta de las excretas y así minimizar la lixiviación. Las heces se recogieron con ayuda de una manguera de plástico, a medida que eran emitidas, posteriormente se lavaron con agua destilada y enseguida se elimino el agua en exceso de los frascos por decantación o con la ayuda de una micropipeta.

La colecta se llevo a cabo durante 10 días hasta obtener 100 mg de heces secas las cuales fueron diariamente congeladas a -12°C y se concentraran en frascos de vidrio individuales, después de los 10 días las heces se lifolizarón y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C para ser posteriormente analizadas.

Análisis químico de las heces:

Oxido de cromo. De las varias técnicas existentes para la estimación de este compuesto, se decidió utilizar el método Bolin *et al.* (1952) ya que es el de menor costo, rápida determinación y menor grado de interferencias. La técnica consiste en oxidar el cromo Cr_3 a cromato, formando una coloración amarilla cuya intensidad es proporcional a la concentración de cromo. Por otra parte esta técnica ofrece mayor estabilidad y desarrollo de color (necesario para la determinación colorimétrica), con respecto a las demás. Aunado a esto, esta técnica ya ha dado resultados proDescompuestaos en la determinación de cromo en muestras de heces.

Proteínas. Con la finalidad de utilizar solo 30 mg de heces por replicado y sobre la misma muestra determinar cromo y proteínas, se utilizó el método Kjeldhal modificado por Nieto-López (1995), cuya modificación consiste en sustituir los reactivos comúnmente utilizados en la hidrólisis de proteína (se reemplazo el H_2SO_4 por una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{HClO}_4$).

Fórmula para calcular proteína

$$\%N = \frac{14.01 \times \text{ml gastados de la muestra} - \text{ml gastados del blanco} \times \text{molaridad del HCl}}{\text{g de muestra} \times 10}$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times \text{factor específico de la muestra (6.25)}$$

Una vez estandarizada esta técnica y la de óxido de cromo, se determinaron estos parámetros para cada una de las dietas así como para una muestra de caseína comercial, y para las heces, estos resultados se utilizaron para ser incluidos en las fórmulas de determinación de la digestibilidad antes mencionadas.

8.1.3 Sala de bioensayos

El bioensayo para determinar la digestibilidad *in vivo*, se realizó en la sala de zootecnia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. la cual cuenta con un sistema cerrado de recirculación del agua marina sintética, 48 acuarios experimentales, 3 tanques de 500 lt. de capacidad para pre-engorda y 5 tanques de 1100 lt que funcionan tres de ellos como reservorios y dos para abastecer por gravedad agua a los diferentes acuarios. Para controlar la calidad del agua la sala cuenta con 2 contactores biológicos ubicados en los tanques de abastecimiento, 2 filtros de cartucho, 2 de carbón activado y 2 espumadores, además de contar con un sistema cerrado de calefacción del agua salada por intercambio de calor con un serpentín que posee en su interior agua dulce caliente, localizado en el interior de los tanques de abastecimiento.

Diariamente se registró la temperatura y salinidad presentes, y semanalmente se registraron el pH, NH₃, NO₂, y NO₃.

Los acuarios experimentales que fueron utilizados para el experimento, se colocaron dentro de los tanques de pre-engorda para mantener la temperatura constante, así mismo el agua utilizada para el recambio era obtenida de estos para asegurar su calidad.

8.1.4 Características y distribución de los organismos.

Se utilizaron postlarvas de *Penaeus vannamei* con un peso promedio de 400 mg procedentes del laboratorio de producción de postlarvas del Centro de Investigaciones Biológicas localizado en La Paz, Baja California Sur.

Dichas postlarvas se trasladaron a la sala de bioensayos de la F.C.B. en bolsas de plástico con agua marina y oxígeno, dentro de hieleras para luego ser aclimatadas a las condiciones de la sala. El bioensayo contó con tres replicados (en el tiempo) para cada dieta en los cuales los pesos promedio de los organismos fueron de 0.25, 0.4 y 0.55 g respectivamente.

8.1.5 Análisis estadístico

8.1.5.1 Digestibilidad *in vivo* en camarón

Los resultados obtenidos de digestibilidad proteica y de materia seca de las dietas y harinas, se analizaron estadísticamente con un diseño en bloques completos al azar mediante un análisis de varianza de una sola vía seguido por una comparación múltiple de medias por el método de Duncan a una probabilidad de 0.05.

8.1.5.2 Correlación con digestibilidad *in vivo* en otras especies

Se realizó la determinación de el coeficiente de correlación entre la digestibilidad *in vivo* en camarón y la digestibilidad *in vivo* de los diferentes tratamientos en mink, salmón y trucha proporcionados por el Dr. I. Pike, con la finalidad de determinar si estos resultados podían ser utilizados para predecir la digestibilidad en camarón. En los casos donde el coeficiente de correlación tuvo una probabilidad inferior a 0.05, se determinó la ecuación de predicción mediante un análisis de regresión lineal.

8.2 **Determinación de digestibilidad *in vitro***

8.2.1 **Método medición de la tasa inicial de hidrólisis**

Durante la próteolisis, hay liberación de protones producto de la ruptura de enlaces peptídicos, lo cual provoca la disminución de pH en el medio; por lo tanto midiendo la disminución del pH se logra una medición indirecta de la digestibilidad de la proteína.

Existen dos métodos para de determinar este tipo de digestibilidad, en uno se mide el descenso del pH causado por la liberación de protones de los aminoácidos (pH-Shift), en el otro se agrega una base fuerte para mantener constante el pH del medio, cuantificando al final la cantidad de base que se agrega. Se eligió esta segunda forma de determinación (pH-Stat) por los buenos resultados que se han reportado en salmón (Dimes y Haard, 1994) y en camarón (Ezquerria *et al*, 1997).

La determinación del grado de hidrólisis por el método de pH-Stat, se estandarizó utilizando como sustrato caseína y como enzima un homogeneizado enzimático de *L. vannamei*. También se realizaron algunas pruebas utilizando tripsina bovina (o porcina) comercial.

8.2.1.1 Obtención del homogeneizado enzimático

La colecta de hepatopáncreas de camarones *Litopenaeus vannamei* se llevo a acabo en la granja Aquastrat localizada en el ejido de Escuinapa de Hidalgo, Sinaloa. La colecta de las glándulas se llevo a cabo con la ayuda de pinzas y tijeras para ser colocados en hielo por un periodo corto, de 15 a 20 min (o hasta juntar un numero de 30 - 40 ejemplares), para posteriormente ser colocados en un tanque de nitrógeno liquido y trasladados a Monterrey, donde fueron liofilizados y colocados en un ultracongelador a una temperatura de -70 a -80°C (115.66g en total).

8.2.1.2 Preparación del extracto enzimático

Se realizó un primer extracto a partir de 2 glándulas digestivas (0.307g), previamente liofilizadas las cuales fueron en seguida trituradas en 100 ml de buffer TRIS HCl 10mM pH 7.5 a 4°C con la ayuda de un ultratriturador. El triturado fue centrifugado durante 30 min a 10,000 g a -2°C. Los lípidos sobrenadantes fueron separados y eliminados con la ayuda de una espátula. Este primer extracto fue útil para la estandarización de las técnicas de determinación de la

actividad enzimática proteolítica total y específica (Kunitz, 1946, modificado por Clark *et al*, 1986), la actividad tripsina (Erlanger *et al* 1961) y la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (1976). Del mismo modo se elaboró el resto del extracto enzimático.

8.2.1.3 Medición de la actividad enzimática del homogeneizado

Tripsina: La actividad enzimática de la tripsina fue medida por la hidrólisis del sustrato L-Benzoil-Arginina P-Nitro Anidina (BAPNA) 1mM en un buffer TRIS 0.1M, pH 8 (Erlanger *et al* 1961). Esto se registra mediante el cambio de absorbancia durante 10 min a 405 nm para dicho sustrato y la actividad fue expresada como unidades enzima (U) por miligramo de proteína en el extracto, siendo equivalente una unidad enzima a un cambio de 0.001 en absorbancia.

Proteasas totales: La actividad de las proteasas totales se estimó conforme a la hidrólisis de la caseína amarilla (1% en un buffer fosfato 10 mM, pH 7) a 37 °C por 10 min (Kunitz, 1946; modificado por Clark *et al*, 1986). La reacción es bloqueada por 2 ml de ácido Tricloroacético (TCA) frío al 5% mantenida a 2°C durante 30 min. El bloqueo es causado por la precipitación de las proteínas solubles. Después se centrifuga 2,000g durante 10 min y la absorbancia de la solución sobrenadante es determinada a 280 nm. Un blanco fue preparado en las mismas condiciones de la muestra pero con la diferencia de que en éste el TCA fue agregado antes de iniciar la incubación. La tirosina fue utilizada como estándar y la actividad enzimática fue expresada como µg de tirosina liberada por min/g de proteína.

Proteínas: Las proteínas solubles fueron medidas utilizando albúmina bovina como estándar por el método de Bradford (1976); cuyo principio es la unión de las proteínas con un colorante, el azul brillante de coomassie G 250. La sensibilidad de esta técnica es de 0.1 µg/ml

8.2.1.4 Estandarización de la técnica de pH-Stat. (ver anexo 1^a)

1).- Se determinó el grado de hidrólisis propio de la caseína en las condiciones de prueba que fueron, 8 mg/ml de proteína ajustados a pH 8 en agua destilada a 25°C con agitación constante, durante 1800 segundos (es decir la hidrólisis que podría presentar la proteína sin la adición de extracto).

2).- Se realizaron pruebas para determinar la cantidad de enzima que se tenía que adicionarse a la muestra tomando 1800 segundos como tiempo de reacción, las pruebas fueron las siguientes.

Caseína al 0.08% + 1 ml de extracto.

Caseína al 0.08% + 2 ml de extracto.

Caseína al 0.08% + 3 ml de extracto.

Caseína al 0.08% + 4 ml de extracto.

3).- Se determinó el tiempo óptimo de reacción es decir el momento en que ya no hay una respuesta lineal y la curva se comienza a volver asintótica.

Una vez estandarizada la técnica, se empezó a determinar el grado de hidrólisis de las harinas de pescado y de las dietas elaboradas con estas harinas, utilizando tres replicados como mínimo para cada análisis (Tabla.-4) de la siguiente manera :

Las harinas y dietas fueron molidas en un molino Cyclotec a 35 mallas y homogeneizadas en agua destilada con un ultratriturador (Substrato). La cantidad de proteína cruda del substrato, fue ajustada a 8 mg/ml y 10 g de la suspensión de substrato se colocaron dentro del recipiente de hidrólisis el pH fue ajustado a 8 con NaOH al 0.1M. La reacción fue iniciada con la adición de 2 ml de el homogeneizado enzimático (con una actividad proteolítica de 6.21 u/mg de proteína). El pH fue mantenido en 8 y se midió la cantidad de NaOH 0.1N utilizado para mantener dicho pH durante 30 min a 25°C. (a diferencia de 1 hora como mencionan Ezquerro *et al.*, 1997).

El grado de hidrólisis de la proteína fue expresado como el numero de enlaces peptídicos hidrolizados en % de el total de enlaces peptídicos presentes en la muestra determinado con la siguiente fórmula. (Dimes and Haard, 1994; Anonymous, 1978):

$$DH\% = \left[\frac{(B * Nb * 1.5 / M * (S\% / 100))}{8} \right] * 100$$

Donde : B = ml de NaOH 0.1N utilizados para mantener el pH en 8, Nb = Normalidad del NaOH, 1.5 es un factor tomado como factor de calibración cuando el pH es de 8 y la temperatura es de 25°C (Anonymous, 1978), M = masa en gramos de la mezcla de reacción, S = concentración de proteína en la mezcla de reacción (%) y 8 es el contenido total de enlaces peptídicos (meq/g) para la proteína de trigo o caseína (Adler- Nissen, 1986). Este ultimo valor fue adoptado tanto para dietas como para harinas de pescado, aunque el valor actual para el músculo de pescado es de 7.3 meq/g (Anonymous, 1978).

Como una modificación adicional el grado de auto hidrólisis de las muestras fue determinado mediante la incubación de estas en las mismas condiciones de prueba, sin la adición del homogeneizado enzimático. Esto nos permitió estimar el grado de hidrólisis corregidos por la adición del extracto:

$$DH\% \text{ corr.} = \left[\frac{((B-B') * Nb * 1.5 / M * (S\% / 100))}{8} \right] * 100$$

Donde B' son los ml de NaOH 0.1N utilizados para mantener el pH en 8.0 durante 30 min 25°C.

8.2.2 Método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con pepsina diluida (A.O.A.C., Torry modificado)

La digestibilidad con pepsina de las muestras fue determinada por el método de la estación de investigación Torry utilizando una solución de pepsina al 0.0002% (Sigma P-7000,

actividad 1:10 0000) como lo describe Olley y Pirie (1966) y Olsen (1969) (ver anexo 1b), con pequeñas modificaciones (las muestras fueron molidas en un molino Cyclotec a 35 mallas en lugar de malla 30; papel filtro Watman #2 fue utilizado en lugar de Schleider and Schull 589² 180 mma y el método Kjeldahl fue llevado a cabo en un sistema kjeltec Tecator).

En el caso de las harinas, además de determinar la digestibilidad con pepsina corregida por el ácido (Formula A), la digestibilidad de la proteína también fue calculada por el método oficial tomando en cuenta el total de la proteína contenida en la muestra (Formula B):

Formula A:

$$\% \text{ dig corregida por el ácido} = \frac{\text{Nitrógeno residual insoluble en ácido} - \text{N. Res. Insol. en solución con pepsina}}{\text{N. Res. Insol. en ácido}} * 100$$

Formula B:

$$\% \text{ digestibilidad (no corregida)} = \frac{\text{N total en la muestra} - \text{N. Residual insoluble en solución con pepsina}}{\text{N. total en la muestra}} * 100$$

8.2.3 Método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con tripsina bovina (tipo A.O.A.C., Torry modificado)

La digestibilidad proteica de las harinas de pescado experimentales fue determinada utilizando como enzima, tripsina bovina y el modelo del A.O.A.C. modificado por el laboratorio de Torry descrito anteriormente (Olsen, 1969, anexo 1). Este método fue adaptado para la utilización de la tripsina bovina de la siguiente manera:

8.2.3.1 Determinación de la concentración enzimática:

1.- La actividad proteolítica total de la pepsina al 0.0002% y la tripsina bovina al 0.1% fue determinada utilizando el método descrito por Clark *et. al.* (1986). Pero en lugar de la caseína se utilizo como sustrato 1% de proteína proveniente de la harina de pescado Tepual. El contenido de proteína de la muestra fue determinado utilizando el método de Bradford (1976), para poder calcular la actividad específica (por g de proteína) de cada enzima. (Tablea 5).

Tabla 5.-Actividades proteolíticas comparadas de la pepsina porcina y la tripsina bovina

Actividad	Pepsina 0.0002%	Tripsina bovina 0.1%
µg de tirosina/min/g Prot	378.05	816.9

2.- Se llevó a cabo una hidrólisis donde la tripsina bovina a 0.05% fue utilizada como enzima (ya que a esta concentración se obtiene la misma actividad proteolítica específica que con la pepsina porcina al 0.0002%), y harina de pescado Tepual (1 g en 150ml de buffer tris 50mM a pH=8) como sustrato. La reacción fue monitoreada por 8 horas.

3.- Utilizando tripsina bovina al 0.05% la reacción es muy rápida por lo que fue necesario diluir la enzima 1/100 para obtener una concentración final de 0.0005%.

8.2.3.2 Condiciones de Digestión (Ver diagrama en Anexo 2).

1.- Se pesaron 3.3 g de harina de pescado Tepual (B-9274) molida a 35 mallas (Cyclotec 1093 Sample mill) + 500 ml de enzima preparada recientemente (tripsina bovina a 0.0005% en buffer tris 50mM, pH=8) en un matraz Erlenmeyer la muestra fue homogeneizada con un Vortex y llevado a pH 8 cuando fuera necesario.

2.- La muestra fue incubada en agitación constante a 37°C por diferentes períodos de tiempo:

10', 20', 30', 40', 50', 60', 2, 4, 8 y 16 horas.

3.- La reacción fue detenida de la siguiente manera:

a) 1 ml de la muestra fue tomado a cada período de tiempo y 2 ml de TCA al 5 % fueron adicionados.

b) 50 ml de muestra fueron tomados a la 1, 2, 4, 8 y 16 horas, y puestos sobre hielo para ser filtrados inmediatamente en papel filtro Watman #2.

Nota: Se llevo a cabo la preparación de un blanco de muestra, el cual se realizó de la misma manera pero sin la adición de enzima.

8.2.3.3 Determinación de los productos de reacción o del sustrato residual (control de la hidrólisis)

El método oficial (A.O.A.C.) mide el nitrógeno Kjeldhal retenido en el filtro (i.e. proteína insoluble residual en el buffer), pero este método es muy laborioso y se dificulta al llevar a cabo un gran número de ensayos, necesarios para estandarizar un nuevo método. Por ello se decidió como alternativa medir la proteína que quedo soluble después del filtrado (i.e. productos de la reacción enzimática) mediante espectrofotometría a 280nm (Spectrophotometer BECKMAN. DU 650) (Schleif and Wensink, 1981).

En el experimento llevado a cabo con la harina de pescado Tepual en las condiciones indicadas anteriormente (8.2.3.2), se determinarán:

- D.O. a 280nm En las muestras de 1 ml + 2 ml de TCA (ver 8.2.3.2.-3.a), después de centrifugar a 3500rpm por 10 min

- Nitrógeno Kjeldhal retenido. En las muestras de 50 ml, (ver 8.2.3.2.-3.b) después de filtrar en papel Watman#2.

8.2.3.4 Determinación de la digestibilidad *in vitro* para las diferentes harinas de pescado

1.- Utilizando el valor obtenido de nitrógeno Kjeldhal a partir de las muestras de 50 ml, la digestibilidad fue calculada con respecto a la proteína insoluble en el buffer (Proteína residual en buffer) (Fórmula A). Además la digestibilidad proteica fue también calculada vía el método oficial tomando el total de proteína presente (Fórmula B).

Formula A:

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{\text{Proteína Residual en buffer} - \text{Proteína Residual insoluble en tripsina bovina}}{\text{Proteína Residual en buffer}}$$

Formula B:

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{\text{Proteína Total en la muestra} - \text{Proteína residual insoluble en tripsina bovina}}{\text{Proteína Total en la muestra}}$$

2.- Utilizando los valores de proteína soluble obtenidos de las muestras de 1ml, la formula A es equivalente a la siguiente:

Formula C:

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{\text{Proteína Soluble en solución de tripsina bovina} - \text{Proteína Soluble en buffer}}{\text{Proteína Total} - \text{Proteína Soluble en buffer}}$$

8.2.3.5 Determinación del tiempo de incubación.

Para evaluar la duración óptima para la hidrólisis de las harinas de pescado de alta digestibilidad así como las de baja digestibilidad se llevo a cabo un experimento con 3 harinas de pescado: Tepual, 539 (alta digestibilidad) y 163 (baja digestibilidad) midiendo la D.O. a 60 min, 90 min, 2, 4, 6, 8, y 16 Horas, en muestras de 1 ml como se describe en b.3a.

8.2.4 **Método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (tipo A.O.A.C., Torry modificado)**

La digestibilidad proteica de las harinas de pescado experimentales fue determinada utilizando como enzima, un homogeneizado enzimático de camarón (el mismo que se utilizó en el método de medición de la tasa inicial de Hidrólisis) y el modelo del A.O.A.C. modificado por el laboratorio de Torry descrito anteriormente (Olsen, 1969. anexo 1). Este método fue adaptado para la utilización de un homogeneizado enzimático de camarón de la siguiente manera:

8.2.4.1 Determinación de la concentración enzimática:

La actividad proteolítica total de la pepsina al 0.0002% (31595 U) y del homogeneizado enzimático (247.42 U) fue determinada utilizando el método descrito por Clark *et. al* (1986). pero en lugar de la caseína se utilizo como sustrato 1% de proteína proveniente de la harina de

pescado Tepual (debido a que la caseína no se disuelve en pH ácido y la pepsina no actúa en pH básico). El contenido de proteína de la muestra fue determinado utilizando el método de Bradford (1976), para poder calcular la actividad específica (por g de proteína) de cada enzima.

Debido a que la actividad proteolítica de la pepsina es mucho mayor que la del homogeneizado de extracto de camarón se decidió probar con otros sustratos como hemoglobina (8713.3U para pepsina vs. 3428.3U para el homogeneizado) e incluso caseína (1986.1U para pepsina vs. 1484.1U para el homogeneizado) aunque con esta última se suponía que la actividad de la pepsina sería menor por la acción del pH básico. En todos los casos la actividad proteolítica total de la pepsina fue mayor que la del homogeneizado, por esta razón se decidió tomar como cantidad de enzima lo mismo que con el modelo de pH-Stat 0.8375 ml de homogeneizado en 50ml de sustrato (Ver mat. y met. 8.2.1.)

8.2.4.2 Condiciones de Digestión (Ver diagrama en Anexo 3).

La digestibilidad de las harinas y dietas fue determinada, utilizando 2 replicados por cada muestra.

- 1.- Las muestras fueron molidas muy finamente con un molino Cyclotec, y pasadas a través de tamiz de malla 35 (en lugar de malla 30) y a diferencia del método oficial en donde se utiliza 1g de harina en 150 ml de ácido independientemente del contenido de proteína, se utilizó para todas las muestras (dietas y harinas), la misma concentración proteica 6.25mg/ml Para ello, una cantidad apropiada de cada harina o dieta fue homogeneizada con 50 ml de buffer tris 50mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8 en un ultra-homogenizador.
- 2.- Las suspensiones de las muestras se llevaron a los vasos de reacción para la hidrólisis y el pH se ajusto a 8 con NaOH 0.1M y se mezclaron con 0.84 ml de extracto enzimático crudo (actividad proteolítica de 1.48 U/mg de proteína).
- 3.- La muestra fue incubada con agitación constante a 30°C (ya que es la misma temperatura a la que se llevo a cabo el bioensayo de digestibilidad *in vivo*) por 6 y 24 horas para las harinas de pescado y 6 horas para las dietas. Al final del período de incubación, las muestras fueron filtradas en un papel Watman #2 (en lugar de Schleider and Schull 589² 180 mma) y la proteína residual fue determinada con el método Kjeldhal en un sistema kjeltec Tecator.

En el caso de las harinas de pescado (a 24 horas de hidrólisis), adicionalmente la proteína soluble fue evaluada a varios períodos de tiempo (10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 2, 4, 6, y 24h), con la finalidad de realizar las curvas de hidrólisis y así determinar el tiempo óptimo de digestión. Esto se realizó tomando muestras de 1 ml de los vasos de digestión; 2 ml de TCA al 5% fueron adicionados y la mezcla se llevo a 2°C por 30 min Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 10 min y se determino la absorbancia del sobrenadante a 280 nm En el caso de las dietas, el mismo experimento fue realizado pero tomando solo 3 diferentes dietas: D17 con HP Tepual, D6 con harina 539 (alta digestibilidad) y D1 con harina 163 (baja digestibilidad).

Así mismo para 3 diferentes harinas de pescado (163, 539, y Tepual), se determino la digestibilidad a 1, 2, 4 y 6 horas con la formula A.

8.2.4.3 Determinación de la digestibilidad *in vitro* para las diferentes harinas de pescado

La digestibilidad de la proteína fue entonces calculada mediante la fórmula del método oficial (A.O.A.C., 1990) tomando el total de proteína presente (Formula A)

Formula A:

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{\text{Total de N en la muestra} - \text{N residual insoluble en homogeneizado}}{\text{Total de N en la muestra}} * 100$$

Por otro lado, se determinó la digestibilidad corregida de las harinas de pescado (Formula B), mediante la utilización de un tercer replicado en el que no se adiciono enzima (para determinar en nitrógeno residual insoluble).

Formula B:

$$\% \text{ dig corregida} = \frac{\text{N residual insoluble en buffer} - \text{N res. Insol en homogenizado}}{\text{N Res. Insol. en buffer}} * 100$$

8.2.4.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para los diferentes métodos de determinación de digestibilidad proteica *in vitro* para las dietas y harinas, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una sola vía seguido por una comparación múltiple de medias por el método de Duncan a una probabilidad de 0.05 (SPSS software), para determinar si existían diferencias entre ellos.

Los resultados del estudio de digestibilidad proteica *in vivo* en camarón fueron correlacionados con los valores *in vitro* y analizados estadísticamente para determinar sus coeficientes de correlación. En los casos donde el coeficiente de correlación presentó una probabilidad inferior a 0.05 se llevo a cabo la determinación de la ecuación de predicción mediante un análisis de regresión lineal.

8.2.5 **Determinación de digestibilidad *in vitro* en otros ingredientes.**

Con la finalidad de determinar si el método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (A.O.A.C., Torry modificado) es eficiente para distinguir entre la digestibilidad de diferentes ingredientes, que son comúnmente utilizados en dietas para camarón, en la Facultad de Ciencias Biológicas, se evaluó la digestibilidad *in vivo* en *L.vannamei* y en *L.stilyrostris* de diferentes fuentes proteicas, así como de dietas preparadas con éstas mediante un bioensayo realizado por la *Biol. América S. Miller* (2000); utilizando como ingredientes: Gluten

de trigo, Harina de trigo, Pasta de soya, Harina de pluma, Harina de Camarón, Harina de Calamar y 2 diferentes harinas de pescado llamadas A y B. Los resultados encontrados por A. Miller se encuentran en la Tabla.-6

Tabla 6.- Digestibilidad *in vivo* de diferentes ingredientes (DAPI) y dietas (DPD).

Ingrediente	<i>L. stilyrostris</i>	<i>L. vannamei</i>
	%DAPI	%DAPI
Gluten trigo	94.6	90
H. Trigo	71.2	
Pasta de soya	90.7	84
H. Pluma	66.8	45
H. Camarón	82.9	61
H. Calamar	89.1	29
Pescado A	81.8	76
Pescado B	79.6	107
Dieta	%DPD	%DPD
Gluten trigo	93.6	90
H. Trigo	90	85
Pasta de soya	91.9	88
H. Pluma	81.1	77
H. Camarón	89.9	82
H. Calamar	91.5	85
Pescado A	88.4	86
Pescado B	87.5	98

La digestibilidad proteica *in vitro* tanto para las harinas como para las dietas, fue determinada con la técnica antes mencionada a 24 horas de hidrólisis, utilizando 2 replicados por cada muestra.

Adicionalmente, se determinó la digestibilidad *in vitro* con la misma técnica pero utilizando un homogeneizado de *L. Stilyrostris*, para lo cual, se obtuvieron hepatopáncreas de esta especie los cuales fueron proporcionados por el programa Maricultura de la F.C.B. y provenían de un bioensayo realizado para la empresa Malta Clayton, dichos organismos presentaban tallas diferentes (chicos, medianos y grandes \approx 5g). Los hepatopáncreas fueron liofilizados y molidos para obtener aproximadamente 3g de hepatopáncreas seco molido.

Posteriormente se preparo el extracto enzimático del mismo modo que el elaborado para *L. vannamei* (ver mat y met- 8.2.1) y se determinó de la actividad enzimática proteolítica total y específica (Kunitz, 1946; modificado por Clark *et al*, 1986), la actividad trípica (Erlanger *et al* 1961) y la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (1976). Esto para determinar la cantidad de homogeneizado requerido para realizar las determinaciones.

En la sección de material y método 8.2.4.1, mencionamos que se utiliza 0.8375 ml de homogeneizado de *L. vannamei* en 50 ml de sustrato, dicho homogeneizado posee una actividad de 1484.1u. El homogeneizado de *L. stylirostris* presenta una actividad de 1462.5 u por lo tanto se utilizo 0.8499 ml en 50 ml de sustrato.

9 RESULTADOS Y DISCUSION

9.1 Análisis Proximal de las harinas de pescado

El análisis proximal de las harinas de pescado en base húmeda se presenta en la tabla 7.

El contenido de proteína y ceniza presentó un rango de 63.6 a 74.8% y 10.2 a 19.63% respectivamente encontrándose una correlación negativa significativa ($r=-0.90$) entre el contenido de proteína y de ceniza de las harinas de pescado (HP) experimentales. Para fines de análisis e interpretación de resultados, se definieron tres grupos de HP considerando su contenido de proteína y ceniza en base húmeda:

- Grupo I. Seis HP con un alto contenido de proteína >72% y un muy bajo contenido de ceniza <12% (F815 arenque, 539 arenque, 163 arenque, F813 capelin, 2204 tobis, TAF-1 anguila de arena) y CPSP.
- Grupo II. Siete HP con 70-65% de proteína y 12-15% de ceniza (11858 desperdicios de arenque, 1986, Fresca anchoveta, 1431 mackerel, 2002, Moderada anchoveta y Descompuesta anchoveta).
- Grupo III. Dos HP pobres en proteína < 64.5%, y ricas en ceniza >18% (3664 desperdicios de pescado blanco y A3481 menhaden).

La composición química de las harinas de pescado ha sido utilizada en la producción de alimentos para acuicultura, ya que, aunque los análisis químicos tienen una sensibilidad limitada, ayudan a indicar la calidad general de un ingrediente (Ezquerria *et al.* 1997). Por ejemplo el alto contenido de ceniza en las harinas puede ser debido a que se trate del procesamiento de desperdicios (desperdicios de pescado blanco) o a que se trate de especies con alto contenido de huesos (menhaden, anchoveta y mackerel tienen mayor proporción de hueso que el arenque); también un bajo contenido de humedad puede ser un indicador de sobrecalentamiento.

El sobrecalentamiento durante el secado puede causar reacciones entre ciertos aminoácidos, reduciendo la digestibilidad de la proteína por ejemplo, la lisina se puede ver envuelta en la reacción de Maillard y se afecta el índice de cisteína:cistina. Estos cambios pueden reducir la utilización de la proteína por los animales (Anderson *et al.*, 1993).

Lan y Pan (1993) indican que el desdoblamiento de la proteína durante el calentamiento provoca la aparición de aminoácidos aromáticos, los cuales se encuentran enclavados en el

interior de la molécula favoreciendo la interacción hidrofóbica intermolecular, lo que da como resultado una disminución de la digestibilidad proporcional al número de aminoácidos aromáticos.

Tabla 7.- Análisis proximal de los ingredientes a probar (base húmeda).

Tipo de pescado	No. ident. Dieta (ingrediente)	Proteína cruda % *	Lípidos %	Ceniza %	Proteína insoluble % **	Proteína soluble % **	Grado de hidrólisis sin enzima %***	Humedad %
Arenque	12 (F815)	74.80	8.65	10.87	49.31	25.48	1.44	9.34
Arenque	6 (539/93)	74.20	8.86	10.2	55.89	18.31	1.46	8.49
Arenque	1 (163/94)	74.00	9.96	10.31	56.96	17.03	3.83	5.55
Lenguado	CPSP	73.50	18.4	5.91	9.73	63.77	0.06	4.4
Capelán	10 (F813)	73.00	6.6	11.45	31.04	41.96	2.98	7.28
Lazones	7 (2204)	72.10	9.03	11.56	43.91	28.18	1.41	9
Lazones	11 (TAF-1)	72.10	9.36	10.17	47.76	24.33	3.23	9.43
Desechos de Arenque	5 (11858)	70.40	11.6	12.31	44.38	26.02	4.55	10.34
	8 (1986)	70.10	8.03	14.03	48.04	22.06	2.34	7.46
Anchoveta	15 FRESCA)	69.6	7.96	14.26	49.05	20.54	4.13	9.39
Macarela	13 (1431)	69.20	10.66	13.05	40.24	28.95	3.00	8.91
	4 (2002)	68.43	8.02	14.79	46.04	22.39	1.45	7.66
Anchoveta	16 (MODERAD A)	67.70	7.58	14.52	43.47	24.23	4.06	10.99
Anchoveta	14 (DESCOMPU ESTA)	65.80	8.75	14.77	44.58	21.22	2.97	11.01
Desechos de pescado plano	3 (3664)	64.20	8.8	18.04	35.93	28.27	3.70	10.72
Menhaden	9 (A3481)	63.60	10.07	19.63	42.85	20.75	4.26	9.58
Jurel	17 (Tepual)	72.13	7.75	13.9	45.75	26.38	3.64	8.1

* Los valores de proteína son de IFOMA, excepto para las harinas #1986 #2002 y Tepual, para las cuales se calcularon por regresión a partir del análisis realizado por FCB/UANL, por medio de una ecuación de regresión establecida entre los valores de IFOMA y los analizados en la FCB/UANL para las otras harinas. Todos los otros datos son de análisis realizados en la FCB/UANL.

** La proteína insoluble fue analizada según Olsen (1969) como el residuo retenido por filtración después de 16 h. de incubación en una solución ácida (ver material y métodos). La proteína soluble se calculó por diferencia entre la proteína cruda e insoluble.

*** El grado de hidrólisis sin enzima se determinó a pH 8 (ver método pH-Stat).

Por otro lado las variaciones en el contenido de ceniza deben ser consideradas como un factor importante ya que como lo mencionan Smith *et al.* (1985) las cenizas y la humedad condicionan el grado de digestibilidad de los alimentos, asimismo Lan y Pan (1993), argumentan que las cenizas actúan como activadores de proteasas. Por su parte Hajen *et al.* (1993b) indican que existe una relación inversa entre el contenido de cenizas y la digestibilidad.

La humedad fue de 5.6 a 11.0%; la harina de arenque 163 fue la HP con el mas bajo contenido de humedad (5.55%), reflejando un excesivo proceso de secado o sobrecalentamiento. Por otro lado 4 harinas fueron especialmente altas en humedad: >10% (11858 desperdicios de arenque, Moderada anchoveta, 3664 desperdicios de pescado blanco, y Descompuesta anchoveta).

El contenido de lípidos varió entre 6.6 y 11.6; HP A3481 menhaden, 1431 mackerel y 11858 desperdicios de arenque fueron particularmente ricas en lípidos (> 10%).

El CPSP presentó un alto contenido de proteína (73.5%), el más alto contenido de lípidos (18.4%) y el mas bajo de ceniza (5.9%) y humedad (4.4%) en comparación con todas las muestras de HP. Esta composición corresponde a una variedad de CPSP llamada Special G, en la cual durante el procesamiento de elaboración, se eliminan los huesos antes de hidrolizar la proteína y además no es desgrasada .

El contenido de proteína soluble en ácido en la harina de pescado determinado bajo condiciones de ácido débil (150 ml de HCl 0.075 N para 1g de harina, ver apéndice 1), fue muy variable, tres grandes grupos de harinas de pescado pueden ser visualizados: uno con un contenido de proteína soluble de 17 a 22.4% (n=7 HP), con las harinas noruegas de arenque 539/93 y 163/94 presentando los valores mas bajos de proteína soluble (17 y 18.3% respectivamente), lo que refleja estas dos harinas fueron hechas principalmente de torta de prensa sin solubles concentrados adicionados. Un segundo grupo con proteína soluble de 24.2 a 29% (n=7) y un tercer grupo con solo una HP (F813) con 42%. El CPSP, como se esperaba, tiene mas de la mitad de la proteína soluble en ácido (63.77%) ya que es una proteína que fue previamente hidrolizada.

Un contenido de proteína soluble alto en las harinas nos puede indicar que se trata de harinas enteras (con solubles concentrados adicionados), o de harinas elaboradas con materia prima en descomposición, lo cual trae consigo la presencia de péptidos, aminoácidos libres y amonio lo que disminuye el valor nutricional del producto final (Abdo, 1994). La síntesis óptima de proteína requiere que los aminoácidos necesarios estén simultáneamente disponibles en el lugar de la síntesis proteica y al estar los aminoácidos libres la tasa de absorción es diferente a los que están ligados a proteínas y por lo tanto la síntesis no ocurre (Akiyama, *et al.* 1991). La presencia de aminoácidos libres y pequeños péptidos puede provocar una sobre estimación de la digestibilidad.

9.2 Análisis proximal y lixiviación de las Dietas.

Los resultados que se presentan en la tabla 8 muestran pequeñas diferencias entre las distintas dietas. El contenido de proteína, ceniza y lípidos de las dietas se relaciona muy bien con la composición de las harinas examinadas. El contenido de proteína de las dietas muestra un rango que va de 39.7 a 44.9 con excepción de la dieta de referencia que obtuvo un valor de 30.4% debido a la ausencia de harina de pescado experimental en esta dieta. El contenido de ceniza de las dietas va de 13.10 a 15.65% y el contenido de lípidos presentó un rango de 7.37 a 10.22% para las dietas con harinas de pescado y el mas alto valor (13.37%) para la dieta con CPSP.

Tabla 8.- Análisis proximal de las dietas (base húmeda) y pérdida de material seca después de 1 h. de inmersión en agua marina (35ppt)

Proteína en ing prueba %	No.ident. (dieta e ingrediente)	Proteína calculada %	Proteína analizada %	Lípidos %	Fibra %	Ceniza %	E.L.N. %	Humedad %	% Lixiviación
74.80	12 (F815)	43.72	44.28	8.87	0.83	13.39	25.13	7.49	16.79
74.20	6 (539/93)	43.54	44.91	8.94	1.05	13.10	25.87	6.14	15.37
74.00	1 (163/94)	43.48	41.58	9.34	1.06	13.48	28.39	6.15	13.42
73.50	2 (CPSP)	43.33	41.85	13.37	0.79	13.24	23.02	7.74	25.70
73.00	10 (F813)	43.18	44.08	8.30	0.99	13.39	24.98	8.26	25.02
72.10	7 (2204)	42.91	42.52	10.22	1.10	14.09	25.67	6.41	22.12
72.10	11 (TAF-1)	42.91	41.60	8.66	1.09	13.49	28.40	6.78	18.58
70.40	5 (11858)	42.40	41.59	9.62	—	14.05	27.81	6.94	13.57
70.10	8 (1986)	42.31	40.93	8.86	0.91	14.52	28.28	6.50	22.61
69.6	15 (Fresca)	42.16	40.94	8.00	0.83	14.12	28.58	7.54	22.04
69.20	13 (1431)	42.04	42.05	9.52	1.05	13.40	25.19	8.78	15.55
68.43	4 (2002)	41.81	40.49	9.08	0.88	14.12	28.40	7.03	16.90
67.70	16 (Moderada)	41.59	39.69	8.17	0.86	14.40	28.29	8.60	20.27
65.80	14 (Descompuesta)	41.02	42.3	7.41	1.00	14.37	26.66	8.26	18.79
64.20	3 (3664)	40.54	40.37	8.47	0.96	15.47	28.11	6.62	14.72
63.60	9 (A3481)	40.36	39.94	8.69	1.04	15.65	28.11	6.58	18.48
	17 (Basal dieta)	30.4	30.4	7.37	1.20	14.31	39.74	6.99	29.04

EL.N.=Extracto libre de Nitrógeno.

La lixiviación de las dietas en agua, expresada como el porcentaje de la pérdida de materia seca después de una hora de inmersión en agua marina, fue significativamente diferente entre las dietas y muestra un rango que va de 13.4 a 29 %. La pérdida mas alta de materia seca (29 %) fue observada para la dieta basal, probablemente debido a su alto contenido de pasta de soya, cuyas propiedades mecánicas desfavorecen la estabilidad del pellet. Debido a que esta dieta es utilizada en un 70% de inclusión en las dietas experimentales, era de esperarse que su

lixiviación fuera también alta, sin embargo la inclusión de las harinas de pescado mejoró la estabilidad.

No se obtuvo una correlación significativa entre lixiviación y las características de las dietas experimentales o las harinas de pescado, excepto con el contenido de proteína soluble de las HP ($r=0.60$). Altas tasas de lixiviación ($>20\%$) fueron observadas en las dietas elaboradas con la harina F813 (capelín), 1986, 2204 (tobis), FRESCA, MODERADA (anchoveta), y CPSP, las cuales tenían el contenido mas alto de proteína soluble (Tabla 7). Las tasas de lixiviación de las otras dietas experimentales se encontraron entre 13.4% y 18.5 %.

La lixiviación también puede ser utilizada como un parámetro de calidad ya que si el alimento no es estable, ocasiona la perdida de una gran cantidad de nutrientes y por ende una sobreestimación de la digestibilidad, además se incrementa la posibilidad de contaminación de las heces con alimento durante el sifoneo (Lee y Lawrence, 1997), así mismo una pobre estabilidad da como resultado una contaminación elevada del agua.

9.3 Evaluación de la digestibilidad *in vivo*

9.3.1 Determinación de la digestibilidad *in vivo* en camarón

El bioensayo *in vivo* permitió diferenciar la digestibilidad de las HP, ya que los ANOVA mostraron diferencias significativas (Tabla 9, $P < 0.0001$).

El rango de digestibilidad de la materia seca de las dietas (DAMSD 84.5-75.7%) fue mas pequeño que para las harinas (DAMSHP 84.9-56.0%). La digestibilidad de la proteína también presentó un rango mas corto para las dietas (DAPD 94.0-84.1=9.9%) que para las HP (DAPHP 98.7-75.8=22.9%), debido probablemente a que en las dietas, el 70% de la digestibilidad es ocasionado por la inclusión de la dieta de referencia y solo 30% proviene de la inclusión de la harina de pescado, por lo que al analizar solo la digestión de las harinas las diferencias se vuelven mayores. Además, las diferencias de calidad de las harinas se ven disminuidas al ser agregadas a un alimento terminado, esto siendo ocasionado probablemente por los efectos asociativos entre los ingrediente (Brown *et al.*, 1989).

En general, la digestibilidad proteica de la dieta o HP en camarón fue mas alta que la digestibilidad de la materia seca, probando que los otros nutrientes eran menos digestibles que la proteína (Akiyama, et al. 1993).

La digestibilidad proteica y de la materia seca fue generalmente mas baja para los ingredientes (HP) que para las dietas, salvo para el CPSP y la harina F813 (ésta con el mas alto contenido de proteína soluble, después del CPSP), las cuales tuvieron la digestibilidad mas alta de materia seca o proteína, así como las dietas correspondientes tenían las mas altas digestibilidades (# 2 y 10). La digestibilidad de la materia seca de estas dos dietas fue igualada solo por la dieta base (84.36%), y las tres tuvieron la mas alta lixiviación. Por lo tanto,

aparentemente la digestibilidad fue sobreestimada por los nutrientes solubles lixiviados antes de la digestión.

Tabla 9. Digestibilidad en camarón de las dietas e ingredientes de prueba.

Dietas					Ingredientes de prueba					
No. Ident dietas	DAMSD (%)		DAPD (%)		Proteína %	Id.#	DAMSHP (%)		DAPHP (%)	
	Promedio	DE	Promedio	DE			Promedio	DE	Promedio	DE
12	83.61 ef	0.88	91.81 fg	0.63	74.8	F815	81.83 de	2.95	91.02 fg	1.20
6	83.43 ef	0.27	91.42 efg	0.36	74.2	539/93	81.28 de	0.90	88.22 ef	0.68
1	75.68 a	1.16	84.13 a	0.84	74	163/94	56.03 a	3.78	75.84 a	1.63
2	84.53 f	1.07	94.00 h	0.44	73.5	CPSP	84.93 e	3.47	98.74 h	0.88
10	84.33 f	1.71	92.94 gh	1.05	73	F813	84.27 e	5.64	95.98 h	2.07
7	80.01 c	0.71	86.99 b	0.99	72.1	2204	69.80 b	2.37	79.82 b	1.93
11	83.50 ef	0.39	90.70 def	0.74	72.1	TAF	81.47 de	1.31	87.47 def	1.43
5	80.73 cd	1.22	90.32 def	0.38	70.4	11858	72.07 bc	4.13	86.46 cde	0.75
8	80.34 c	0.57	87.24 bc	0.81	70.1	1986	71.05 b	1.88	81.21 b	1.60
15	82.03 cde	1.24	89.02 cd	1.69	69.6	Fresca	76.53 bcd	4.17	85.55 cde	3.37
13	82.65 def	1.32	90.96 def	1.20	69.2	1431	78.64 cde	4.40	92.20 g	2.43
4	80.30 c	1.94	87.56 bc	1.79	68.4	2002	70.92 b	6.42	82.61 bc	3.60
16	80.77 cd	2.06	88.95 cd	1.77	67.7	Moderad a	72.16 bc	7.02	86.49 cde	3.60
14	81.72 cde	0.89	90.52 def	1.29	65.8	Descomp uesta	75.37 bcd	3.01	88.96 efg	2.65
3	77.86 b	1.08	89.49 de	0.97	64.2	3664	62.30 a	3.67	83.71 bcd	1.99
9	82.92 ef	0.32	89.97 def	0.84	63.6	A3481	79.51 de	1.08	85.27 cde	1.73
17	84.36 f	0.31	91.61 fg	0.29						
Max	84.5		94.0				84.9		98.7	
Min	75.7		84.1				56.0		75.8	
Rango	8.8		9.9				28.9		22.9	
Prob. ANOVA	P<0.0001		P<0.0001				P<0.000		P<0.0001	

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas con riesgo < 0.05

DE = Desviación estándar, n= 3 .

La importancia de esta noción puede ser evaluada mediante la aplicación de una corrección por la lixiviación de los resultados de digestibilidad de la materia seca (Tabla 10): CPSP y F813 son enviados a cuarto lugar en términos de DAMSHP, debajo de las harinas de

pescado 539/93, F815 y TAF-1. Esta corrección llevo a una disminución de DAMSHP para las harinas de pescado ricas en proteína soluble, pero un pequeño incremento de DAMSHP se observo para todas las otras harinas, esto se explica tomando en cuenta la reducción de la materia seca ingerida en las dietas lixiviadas cuando se calcula la digestibilidad de la materia seca de la dieta (ver la modificación de la fórmula en Mat y Método (8.1.2.3)).

Tabla 10. Digestibilidad aparente de la materia seca en dietas (DAMSD) e ingredientes prueba (DAMSHP), corregida por las perdidas de nutrientes en agua antes de la ingestión (LIXCOR).

No. id. HP	Proteína % B.H.	DAMSD LIXCOR	DAMSD	Diferencia	DAMSHP LIXCOR	DAMSHP	Diferencia
F815	74.80	80.30	83.61	-3.31	85.82	81.83	3.98
539/93	74.20	80.43	83.43	-3.01	86.19	81.28	4.92
163/94	74.00	71.91	75.68	-3.77	58.22	56.03	2.18
CPSP	73.50	79.18	84.53	-5.35	81.93	84.93	-3.00
F813	73.00	79.10	84.33	-5.23	81.75	84.27	-2.52
2204	72.10	74.33	80.01	-5.68	65.82	69.80	-3.98
TAF-1	72.10	79.73	83.50	-3.77	83.93	81.47	2.46
11858	70.40	77.70	80.73	-3.03	77.09	72.07	5.02
1986	70.10	74.59	80.34	-5.75	66.82	71.05	-4.23
Fresca	69.6	76.95	82.03	-5.08	74.56	76.53	-1.97
1431	69.20	79.45	82.65	-3.19	82.97	78.64	4.33
2002	68.43	76.30	80.30	-4.01	72.46	70.92	1.54
Moderada	67.70	75.88	80.77	-4.89	70.90	72.16	-1.26
Descompues ta	65.80	77.49	81.72	-4.23	76.35	75.37	0.98
3664	64.20	74.04	77.86	-3.82	64.66	62.30	2.35
A3481	63.60	79.04	82.92	-3.87	81.61	79.51	2.10
Dieta referencia		77.96	84.36	-6.40			

BH= base húmeda

La digestibilidad de la materia seca de la dieta generalmente disminuye, especialmente para las dietas con alta lixiviación. Este fue el caso para la dieta de base, que perdió 29% de su materia seca después de 1 hora en agua marina. Entonces la digestibilidad de los ingredientes es calculada substrayendo la fracción de la materia seca digestible de la dieta de base (aproximadamente 70% de la dieta de la prueba), del total de materia seca digestible en la dieta experimental; esta diferencia se incrementa si la dieta experimental es menos propensa a la lixiviación que la dieta de base, así como disminuye por consecuencia la digestibilidad. Esto último ocurrió en las dietas experimentales que incluyen harinas con contenidos de proteína soluble mas bajas de lo normal. En contraste cuando las harinas de pescado fueron ricas en proteína soluble, la digestibilidad de la materia seca corregida de la dieta experimental decrece a la misma tasa que en la dieta de base, y la diferencia entre el 100% de la materia seca digestible

de la dieta experimental y el 70% de la materia seca digestible de la dieta de base generalmente disminuye. Así la DAPHP corregida para las harinas sujetas a lixiviación disminuye, mientras la DAPHP corregida para las harinas de pescado apenas solubles se incrementó.

Se observa que la harina de anchoveta 163/94 (de baja digestibilidad) y la 539/93 (de alta digestibilidad) fueron ambas favorecidas por la corrección por lixiviación, debido a la baja tasa de lixiviación de sus respectivas dietas experimentales.

Se encontró que la frescura de la materia prima afecta ligeramente su digestibilidad en camarón. La harina de pescado hecha con pescado descompuesto (anchoveta DESCOMPUESTA, en dieta 14) mostró un incremento en la digestibilidad, pero sin significancia estadística. Esto puede ser atribuido a su alto grado de hidrólisis (lo cual es también cierto para el CPSP), ya que el camarón puede absorber componentes pre-hidrolizados más rápidamente, pero esto puede ser también atribuido a una alta tasa de lixiviación, debido a una alta solubilidad de la proteína hidrolizada, tal como se ha demostrado anteriormente. Los resultados sugieren que una harina de pescado que provoca una reducción en el crecimiento del camarón, como la de "anchoveta DESCOMPUESTA" (Ricque et al., 1998) puede tener una buena digestibilidad. Por ello la digestibilidad no debe ser el único criterio de calidad a considerar al momento de seleccionar una harina de pescado para dietas de camarón.

Para todos los parámetros evaluados, la harina de pescado 163/94 siempre presentó los valores más bajos (lo cual puede ser también observado en los tratamientos D y E con salmónidos, ver tabla 3). La gran diferencia entre esta harina y todas las otras radica probablemente en el excesivo proceso de secado, lo cual sugiere que el camarón es muy sensible al deterioro térmico de las proteínas de pescado. Pike (1990 y 1994) menciona que cuando la temperatura de proceso se eleva por arriba de 80°C, el crecimiento y la digestibilidad proteica en el salmón del Atlántico se ven afectados negativamente.

9.3.2 Correlación con la digestibilidad *in vivo* en otras especies.

Comparando el rango obtenido para la DAPHP obtenido en camarón (22.9%), y el rango de DAPHP obtenido para los diferentes bioensayos con salmónidos (entre 9.4 y 13.2% dependiendo del experimento, ver tabla 2), observamos que el rango en camarones fue más grande sin embargo, la digestibilidad más alta observada en camarón (98.7% para el CPSP) no fue mucho más alta que la más alta digestibilidad obtenida en salmónidos (97.9% para el CPSP en el tratamiento A), y la digestibilidad más baja en camarón (75.8% para la HP 163/94) no fue mucho más baja que la observada para la HP A3481 y 163/94 en los tratamientos C y D respectivamente (76.2 y 76.3%).

El rango de la digestibilidad proteica de las HP en mink (11.6%), al igual que en los salmónidos, fue relativamente estrecho comparado con el obtenido para la DAPHP en camarón. Por lo tanto parece que las postlarvas de camarón (250-550 mg), son ligeramente más sensibles que el mink o los salmónidos a las diferencias de calidad de las harinas de pescado en términos de digestibilidad, y que los extremos alto o bajo de los valores de DAPHP exceden escasamente la extensión de estos coeficientes en salmónidos.

La correlación entre la digestibilidad proteica *in vivo* en camarón y la de las diferentes especies de salmónidos (Tabla 11) fue apenas significativa para los tratamientos B, C, D y E (P de 0.02 a 0.11), y no significativa para el tratamiento A, mientras el coeficiente de correlación con mink fue solo de $r^2=0.04$, con una $p=0.46$.

Tabla 11. – Coeficiente de correlación (r y r^2) de las DAPHP en camarón con mink ($n=15$), trucha y salmón ($n=13$)

	Camarón		
	r	r^2	p
Mink	0.2075	0.0430	0.4579
Trucha A	-0.0247	0.0006	0.9361
Trucha B	0.5079	0.2579	0.0763
Salmón C	0.5740	0.3295	0.0402
Salmón D	0.6211	0.3857	0.0234
Salmón E	0.4664	0.2175	0.1081

DAPHP= Digestibilidad aparente de proteína en los ingredientes prueba (harinas de pescado y CPSP).

Los resultados del tratamiento A no deben ser considerados, ya que estos no se correlacionan incluso con los otros tratamientos en mink o salmónidos. Los resultados de digestibilidad en mink pueden no ser perfectamente representativos, ya que estos fueron obtenidos a partir de sub-muestras de grandes lotes de producción, las cuales eran diferentes de las utilizadas para los experimentos en salmónidos y camarón; sin embargo la DAPHP en mink fue significativamente correlacionada con la de los salmónidos en el tratamiento B, C, D y E ($r = 0.615$ ($p=0.033$), 0.669 ($p=0.017$), 0.635 ($p=0.027$) y 0.582 ($p=0.047$) respectivamente, $n=12$). Por lo que la digestibilidad en mink, no puede ser utilizada como un indicador de la digestibilidad en camarón.

Las correlaciones con los resultados del tratamiento D para salmón, que fue donde se obtuvieron las mejores correlaciones, fueron posteriormente examinadas después de aplicar dos correcciones: excluyendo de la base de datos las harinas de pescado que presentaban bajo contenido de proteína y alto de ceniza (Fig1), y calculando los coeficientes de digestibilidad corregidos por lixiviación (Fig 2), con la finalidad de incrementar la correlación.

- Cuando se excluyeron las harinas de pescado # 3664 y A3481, la correlación entre DAPHP para camarón y la del tratamiento D de salmón incrementó de $r^2=0.39$ ($n=13$) a $r^2=0.45$ ($n=11$) (Fig 1).

- Cuando se aplicó la corrección por la lixiviación de la materia seca de la dieta en la DAMSHP para camarón, su correlación con la digestibilidad proteica en salmón (trat. D) también mejoró de $r^2=0.67$ a $r^2=0.75$ ($n=11$ excluyendo las harinas de pescado con bajo contenido de proteína y alto de ceniza) (Fig 2). Se observa además que la digestibilidad proteica en salmón se correlaciona mejor con la DAMSHP no corregida ($r^2=0.67$) (Fig 2) que con la DAPHP ($r^2=0.39$) (Fig1) para camarón.

Figura 1.- Correlación de la digestibilidad en camarón y salmón (trat D), con o sin HP de baja proteína /alta ceniza.

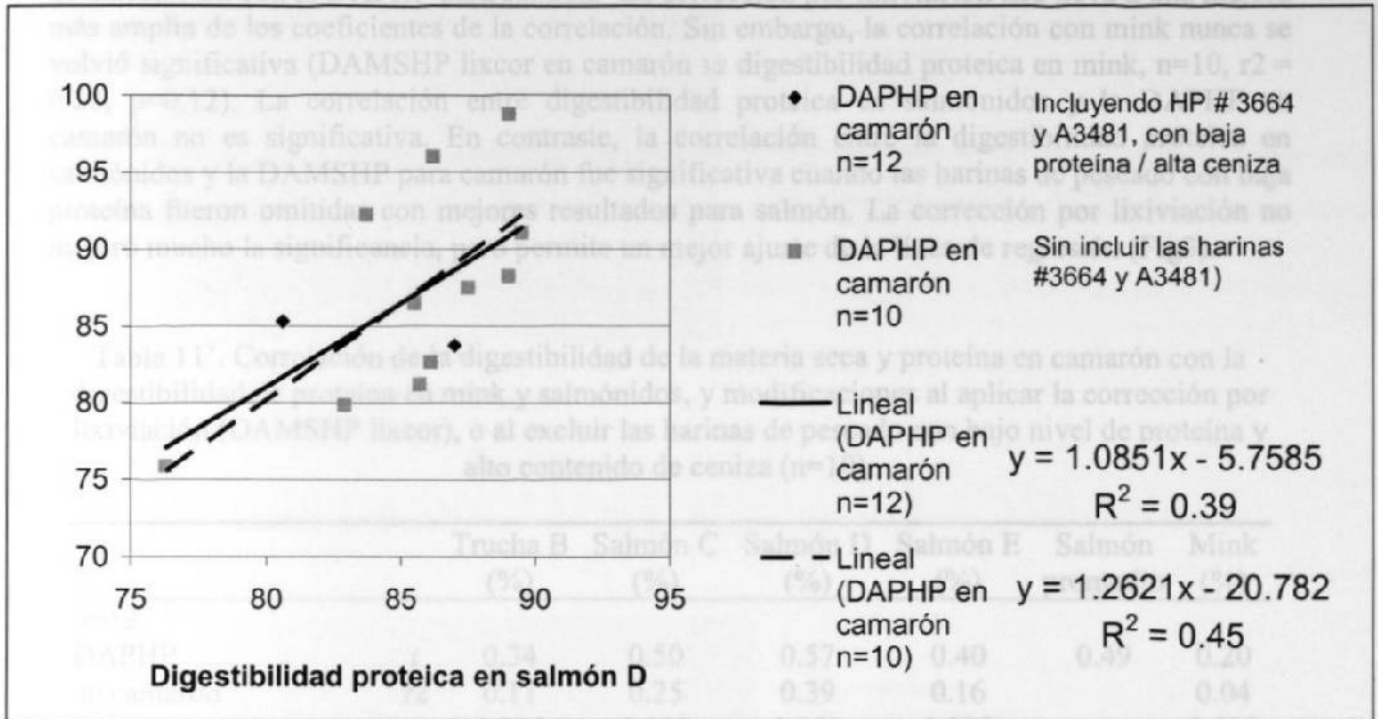
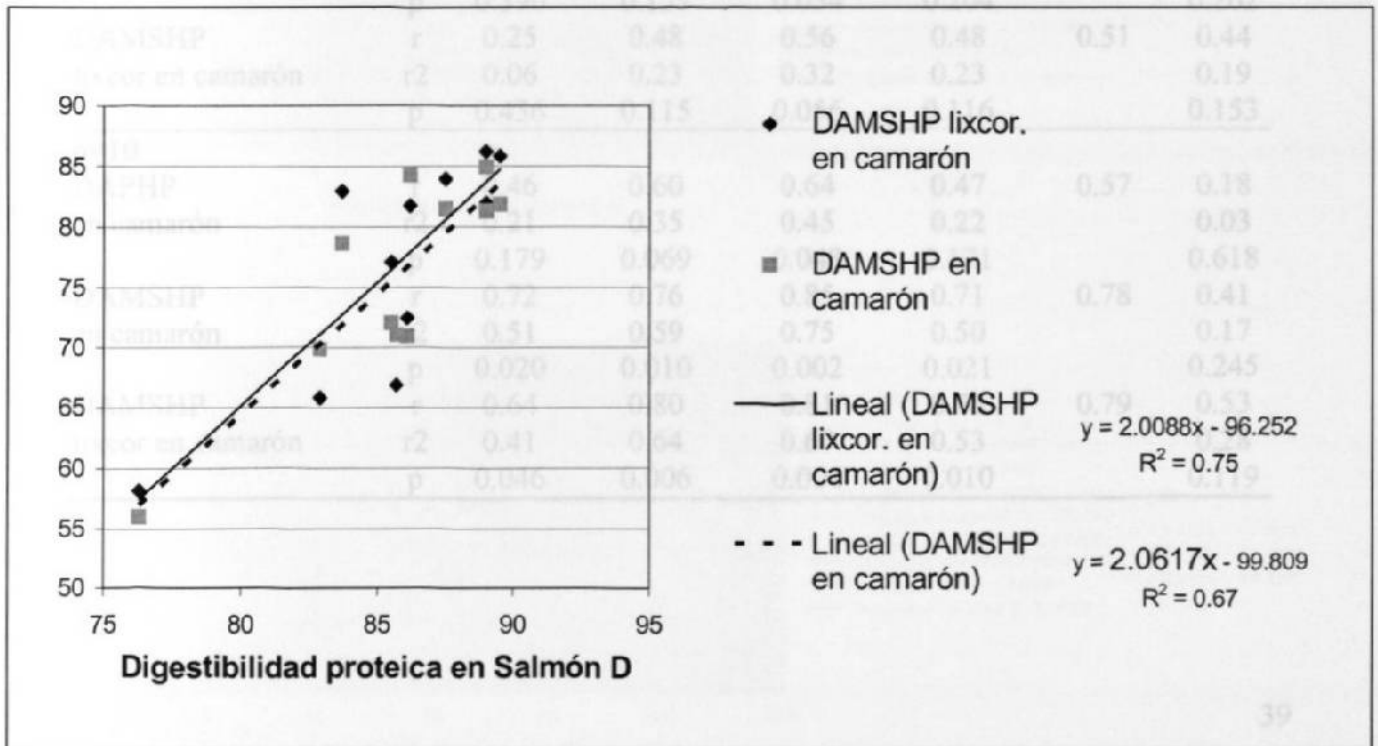


Figura 2.- Correlación de la DAMSHP en camarón con DAPHP en salmón (Trat D) excluyendo las harinas de baja proteína/alta ceniza, con o sin corrección por lixiviación.

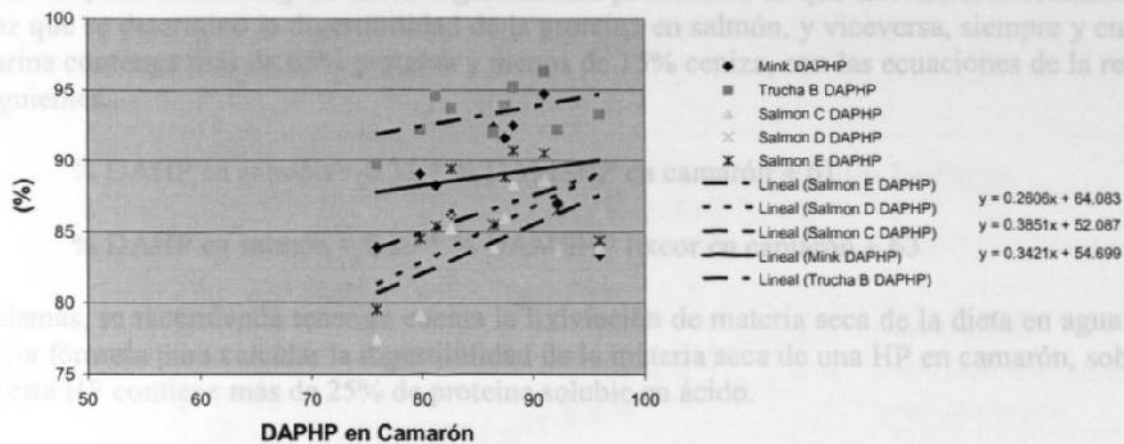


Se establecieron los coeficientes de correlación con las otras evaluaciones realizadas en trucha, salmón, y mink, aplicando las mismas restricciones y correcciones (tabla 11'): al omitir las harinas con baja proteína y alta ceniza se obtiene un evidente incremento de los coeficientes de correlación con la DAPHP para salmón. La corrección por lixiviación nos lleva a una mejora más amplia de los coeficientes de la correlación. Sin embargo, la correlación con mink nunca se volvió significativa (DAMSHP lixcor en camarón vs digestibilidad proteica en mink, $n=10$, $r^2 = 0.28$, $p=0.12$). La correlación entre digestibilidad proteica en salmónidos y la DAPHP en camarón no es significativa. En contraste, la correlación entre la digestibilidad proteica en salmónidos y la DAMSHP para camarón fue significativa cuando las harinas de pescado con baja proteína fueron omitidas con mejores resultados para salmón. La corrección por lixiviación no mejoró mucho la significancia, pero permite un mejor ajuste de la línea de regresión (Fig3).

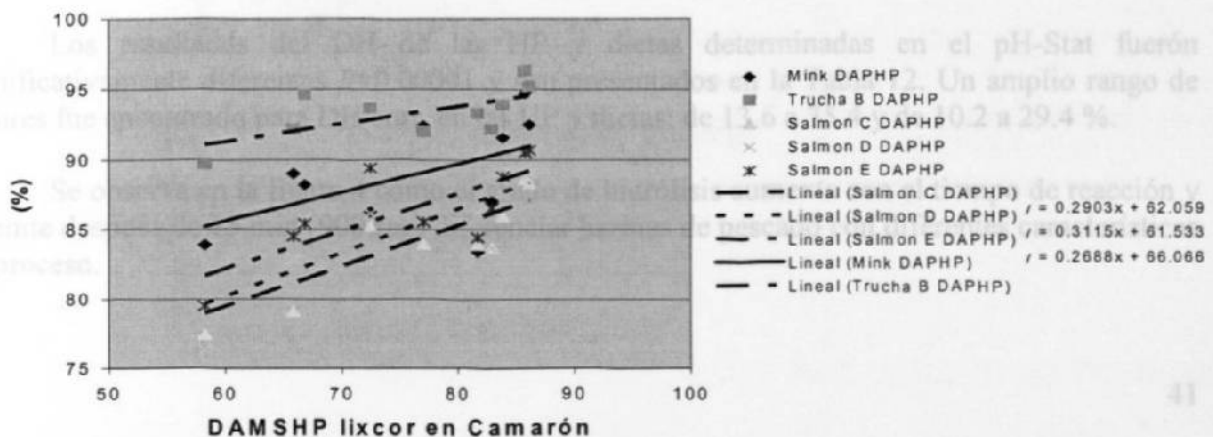
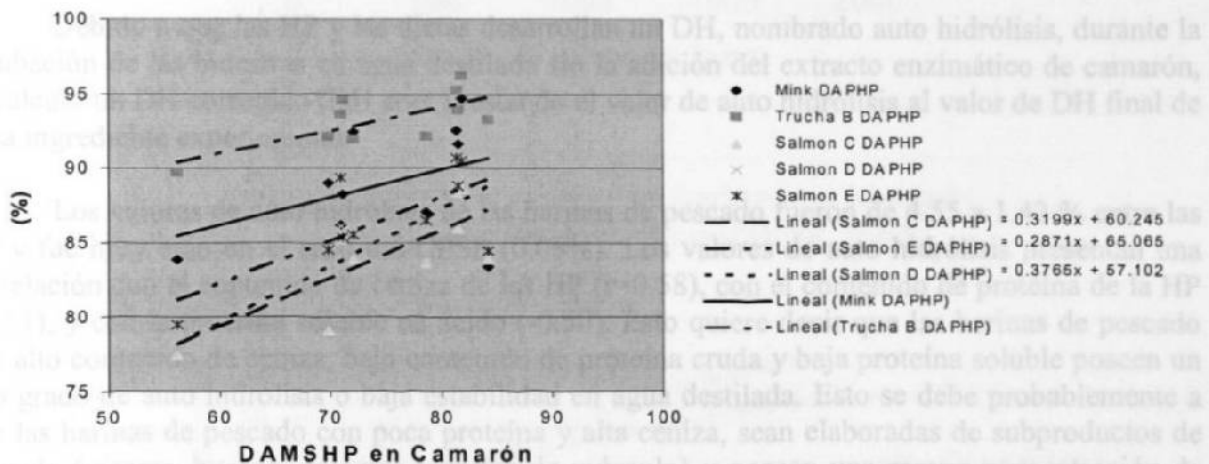
Tabla 11'. Correlación de la digestibilidad de la materia seca y proteína en camarón con la digestibilidad de proteína en mink y salmónidos, y modificaciones al aplicar la corrección por lixiviación (DAMSHP lixcor), o al excluir las harinas de pescado con bajo nivel de proteína y alto contenido de ceniza ($n=10$).

		Trucha B (%)	Salmón C (%)	Salmón D (%)	Salmón E (%)	Salmón promedio	Mink (%)
n=12							
DAPHP en camarón	r	0.34	0.50	0.57	0.40	0.49	0.20
	r ²	0.11	0.25	0.39	0.16		0.04
	p	0.285	0.099	0.051	0.200		0.528
DAMSHP en camarón	r	0.27	0.44	0.57	0.39	0.47	0.35
	r ²	0.07	0.19	0.32	0.16		0.12
	p	0.390	0.157	0.054	0.204		0.262
DAMSHP lixcor en camarón	r	0.25	0.48	0.56	0.48	0.51	0.44
	r ²	0.06	0.23	0.32	0.23		0.19
	p	0.436	0.115	0.056	0.116		0.153
n=10							
DAPHP en camarón	r	0.46	0.60	0.64	0.47	0.57	0.18
	r ²	0.21	0.35	0.45	0.22		0.03
	p	0.179	0.069	0.048	0.171		0.618
DAMSHP en camarón	r	0.72	0.76	0.85	0.71	0.78	0.41
	r ²	0.51	0.59	0.75	0.50		0.17
	p	0.020	0.010	0.002	0.021		0.245
DAMSHP lixcor en camarón	r	0.64	0.80	0.81	0.76	0.79	0.53
	r ²	0.41	0.64	0.67	0.53		0.28
	p	0.046	0.006	0.004	0.010		0.119

Figura 3.- Correlación de la DAPHP en trucha, mink y salmón con la DAPHP (IAPD), DAMSHP (IADMD) y DAMSHP lixcor en camarón (n=10).



9.4 Determinación del grado de hidrólisis (DH) utilizando pH-Stat para camarón.



Estos resultados muestran que es posible calcular la digestibilidad de la materia seca de una HP para camarón (pero no la digestibilidad proteica es lo que nos interesa realmente) una vez que se determinó la digestibilidad de la proteína en salmón, y viceversa, siempre y cuando la harina contenga más de 65% proteína y menos de 15% ceniza, con las ecuaciones de la regresión siguientes.

$$\% \text{ DAHP en salmón} = 0.33 * \% \text{ DAMSHP en camarón} + 61$$

$$\% \text{ DAHP en salmón} = 0.29 * \% \text{ DAMSHP lixcor en camarón} + 63$$

Además, se recomienda tener en cuenta la lixiviación de materia seca de la dieta en agua de mar en la fórmula para calcular la digestibilidad de la materia seca de una HP en camarón, sobre todo si esta HP contiene más de 25% de proteína soluble en ácido.

9.4 Determinación del grado de hidrólisis (DH) utilizando pH-Stat para camarón.

Debido a que las HP y las dietas desarrollan un DH, nombrado auto hidrólisis, durante la incubación de las muestras en agua destilada sin la adición del extracto enzimático de camarón, se calculo un DH corregido (DH corr.) restando el valor de auto hidrólisis al valor de DH final de cada ingrediente experimental.

Los valores de auto hidrólisis de las harinas de pescado fueron de 4.55 a 1.42 % entre las HP y fue muy bajo en el caso del CPSP (0.06%). Los valores de auto hidrólisis presentan una correlación con el contenido de ceniza de las HP ($r=0.58$), con el contenido de proteína de la HP (-0.51), y con la proteína soluble en ácido (-0.50). Esto quiere decir que las harinas de pescado con alto contenido de ceniza, bajo contenido de proteína cruda y baja proteína soluble poseen un alto grado de auto hidrólisis o baja estabilidad en agua destilada. Esto se debe probablemente a que las harinas de pescado con poca proteína y alta ceniza, sean elaboradas de subproductos de pescado (viseras, huesos, escamas y restos de músculo) y poseen una mayor concentración de enzimas propias del pez del cual se obtuvieron, por otro lado la proteína insoluble puede ser hidrolizada y causar cambio en el pH.

Los resultados del DH de las HP y dietas determinadas en el pH-Stat fueron significativamente diferentes $P=0.00001$ y son presentados en la Tabla 12. Un amplio rango de valores fue encontrado para DH corr. en las HP y dietas: de 13.6 a 35.4 y de 10.2 a 29.4 %.

Se observa en la figura 4 como el grado de hidrólisis aumenta con el tiempo de reacción y permite después de 15 min (900 seg) diferenciar harinas de pescado con diferentes características de proceso.

Figura 4.- Cinética del grado de hidrólisis de harinas de anchoveta hechas con materia prima de diferente frescura (Descompuesta, Moderada, Fresca) y de harina de arenque procesadas a baja temperatura (539/93) o alta temperatura (163/94).

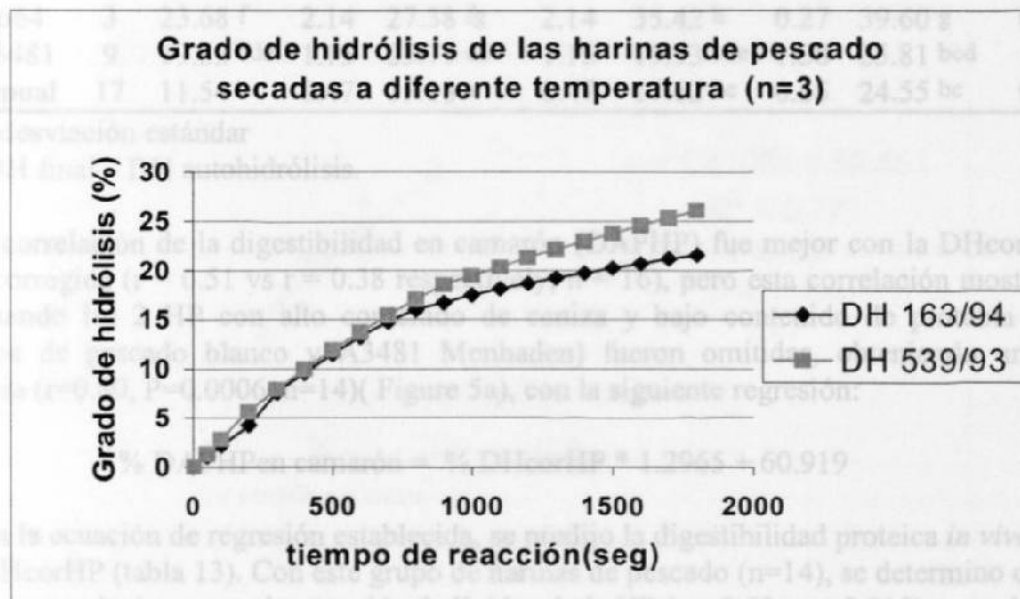
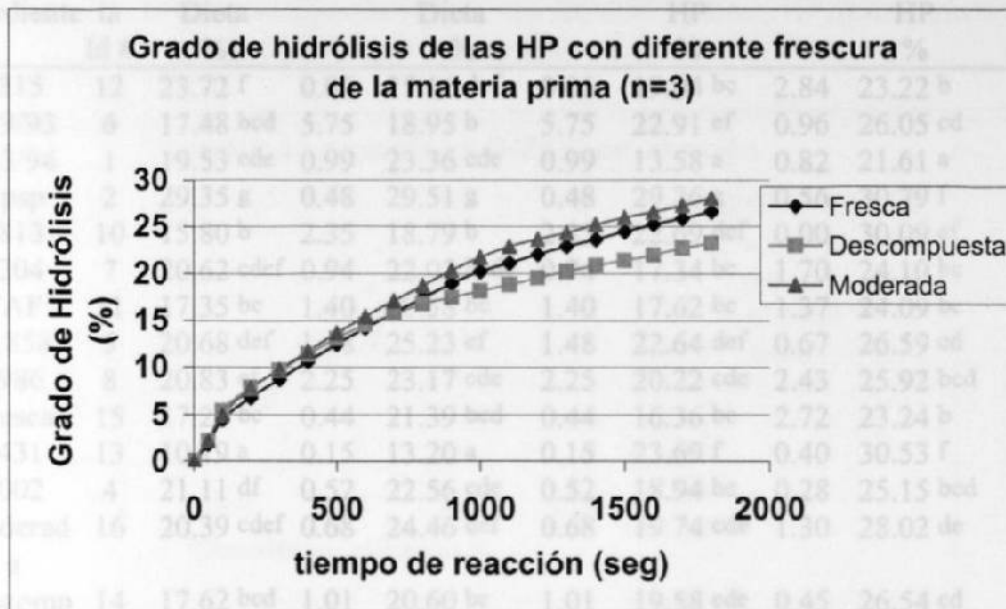


Tabla 12.- Resultados del método pH stat con enzimas de camarón. Grado de hidrólisis de las harinas de pescado y dietas.

Prot %	No. ingrediente	Iden. ta	Die ta	DHcorr de Dieta %	de	DH Dieta %	de	DHcor HP %	de	DH HP %	de
74.8	F815	12	23.72 f	0.06	25.16 def	0.06	19.04 bc	2.84	23.22 b	2.84	
74.2	539/93	6	17.48 bcd	5.75	18.95 b	5.75	22.91 ef	0.96	26.05 cd	0.96	
74.0	163/94	1	19.53 cde	0.99	23.36 cde	0.99	13.58 a	0.82	21.61 a	0.82	
73.5	Cpsp	2	29.35 g	0.48	29.51 g	0.48	29.26 g	0.56	30.79 f	0.56	
73.0	F813	10	15.80 b	2.35	18.79 b	2.35	22.69 def	0.00	30.09 ef	0.00	
72.1	2204	7	20.62 cdef	0.94	22.02 bcde	0.94	17.34 bc	1.70	24.10 bc	1.70	
72.1	TAF	11	17.35 bc	1.40	20.58 bc	1.40	17.62 bc	1.37	24.09 bc	1.37	
70.4	11858	5	20.68 def	1.48	25.23 ef	1.48	22.64 def	0.67	26.59 cd	0.66	
70.1	1986	8	20.83 ef	2.25	23.17 cde	2.25	20.22 cde	2.43	25.92 bcd	2.43	
69.6	Fresca	15	17.26 bc	0.44	21.39 bcd	0.44	16.36 bc	2.72	23.24 b	2.71	
69.2	1431	13	10.19 a	0.15	13.20 a	0.15	23.69 f	0.40	30.53 f	0.40	
68.4	2002	4	21.11 df	0.52	22.56 cde	0.52	18.94 bc	0.28	25.15 bcd	0.28	
67.7	Moderad a	16	20.39 cdef	0.68	24.46 def	0.68	19.74 cde	1.30	28.02 de	1.30	
65.8	Descomp uesta	14	17.62 bcd	1.01	20.60 bc	1.01	19.58 cde	0.45	26.54 cd	0.45	
64.2	3664	3	23.68 f	2.14	27.38 fg	2.14	35.42 h	0.27	39.60 g	0.27	
63.6	A3481	9	19.53 cde	1.15	23.79 cde	1.15	19.93 cde	1.38	25.81 bcd	1.38	
72.1	Tepual	17	11.54 a	0.47	15.18 a	0.47	17.62 bc	0.65	24.55 bc	0.65	

n=3, de.= desviación estándar

DH cor= DH final – DH autohidrólisis.

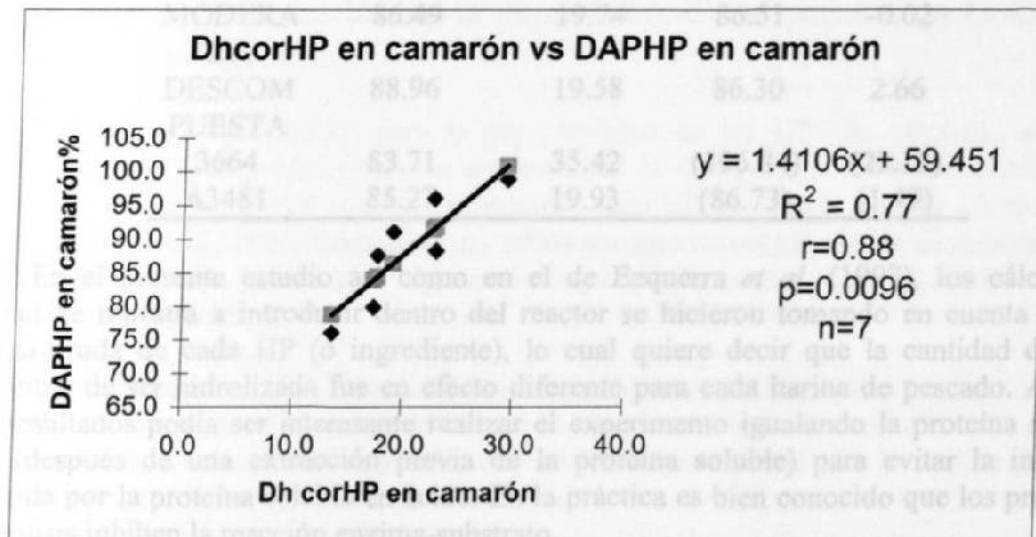
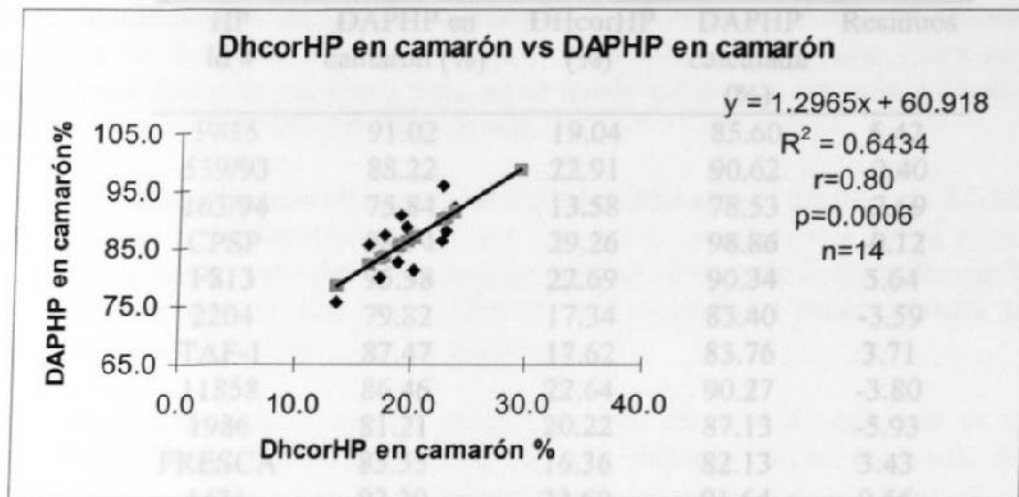
La correlación de la digestibilidad en camarón (DAPHP) fue mejor con la DHcorr que con la no corregida ($r = 0.51$ vs $r = 0.38$ respectively, $n = 16$), pero esta correlación mostró una mejoría cuando las 2 HP con alto contenido de ceniza y bajo contenido de proteína (3664 desperdicios de pescado blanco y A3481 Menhaden) fueron omitidas, obteniendo una alta significancia ($r=0.80$, $P=0.0006$, $n=14$)(Figure 5a), con la siguiente regresión:

$$\% \text{ DAPHP en camarón} = \% \text{ DHcorHP} * 1.2965 + 60.919$$

Con la ecuación de regresión establecida, se predijo la digestibilidad proteica *in vivo* a partir de DHcorHP (tabla 13). Con este grupo de harinas de pescado ($n=14$), se determino que DHcorHP se correlaciona con el contenido de lípidos de la HP ($r = 0.63$, $p = 0.015$) y con la proteína soluble en ácido de la HP ($r = 0.76$, $p=0.002$).

La correlación entre la digestibilidad de la HP *in vivo* y el DhcorHP fue posteriormente determinada ($r=0.88$, $p = 0.0097$) utilizando solo las HP con mas de 72% de proteína y menos del 12% de ceniza (Fig 5b). Esto confirmó que el alto contenido de ceniza (y bajo de proteína) tiene una gran influencia sobre el grado de hidrólisis.

Figura 5.- Regresión lineal entre digestibilidad *in vivo* (DAPHP) y DhcorHP a) sin harinas altas en ceniza/baja proteína b) sin harinas con proteína < 70%.



Por otro lado en este estudio el extracto enzimático de camarón no se obtuvo de los camarones utilizados para el experimento de digestibilidad *in vivo*. De hecho para ambos el coeficiente de correlación obtenido entre los datos *in vivo* e *in vitro* concuerda con lo reportado (0.77) por Ezquerria *et al.* (1997) al comparar la digestibilidad en camarón y en el pH-*in vitro* en un método *in vitro* para determinar la digestión proteica de 3 harinas de pescado.

Stat para diferentes ingredientes, aunque la concentración de enzimas utilizada no fue la misma, ni la fuente de enzimas.

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: $DAPHP = 60.918 + 1.2965 * DHcorHP$).

HP Id #	DAPHP en camarón (%)	DHcorHP (%)	DAPHP calculada (%)	Residuos
F815	91.02	19.04	85.60	5.42
539/93	88.22	22.91	90.62	-2.40
163/94	75.84	13.58	78.53	-2.69
CPSP	98.74	29.26	98.86	-0.12
F813	95.98	22.69	90.34	5.64
2204	79.82	17.34	83.40	-3.59
TAF-1	87.47	17.62	83.76	3.71
11858	86.46	22.64	90.27	-3.80
1986	81.21	20.22	87.13	-5.93
FRESCA	85.55	16.36	82.13	3.43
1431	92.20	23.69	91.64	0.56
2002	82.61	18.94	85.47	-2.87
MODERA DA	86.49	19.74	86.51	-0.02
DESCOM PUESTA	88.96	19.58	86.30	2.66
3664	83.71	35.42	(106.84)	(23.13)
A3481	85.27	19.93	(86.73)	(1.49)

En el presente estudio así como en el de Ezquerria *et al.* (1997), los cálculos de la cantidad de muestra a introducir dentro del reactor se hicieron tomando en cuenta el total de proteína cruda de cada HP (o ingrediente), lo cual quiere decir que la cantidad de proteína susceptible de ser hidrolizada fue en efecto diferente para cada harina de pescado. A la luz de estos resultados podía ser interesante realizar el experimento igualando la proteína residual en ácido (después de una extracción previa de la proteína soluble) para evitar la interferencia producida por la proteína soluble en ácido. En la práctica es bien conocido que los productos de la hidrólisis inhiben la reacción enzima-substrato.

Por otro lado en este estudio el extracto enzimático de camarón no se obtuvo de los mismos camarones utilizados para el experimento de digestibilidad *in vivo*. De hecho para ambos experimentos se utilizó *Litopenaeus vannamei* pero el origen y tamaño fue diferente. Bassompierre (1987) ha demostrado que las isoenzimas de la tripsina del salmón del Atlántico, utilizadas en un método *in vitro* para determinar la digestión proteica de 3 harinas de pescado

diferentes, separan o diferencian a las harinas de pescado en una clasificación jerárquica. Así la eficiencia de la digestión *in vitro* parece depender de las isoformas de las enzimas y la eficiencia de la predicción se puede mejorar utilizando el mismo lote de animales para obtener el extracto enzimático, y para los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

El DH no fue bueno para predecir la digestibilidad de las dietas para camarón. Aunque las HP fueron incluidas en un 30% en las dietas, el DH de las dietas no se correlacionó significativamente con los valores de la digestibilidad *in vivo* de la dieta. El método de pH-Stat con enzimas de camarón puede ser utilizado para obtener algunos valores prácticos en las empresas de elaboración de harinas de pescado (para verificar un tratamiento de temperatura apropiado) o en las compañías que elaboran alimentos para camarón (para seleccionar HP adecuadas para dietas de camarón), pero no se puede utilizar en una granja como método para seleccionar alimentos de diferentes fabricantes.

Otros estudios hechos en nuestro laboratorio, utilizando el mismo lote de camarones para la determinación de la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, muestran una buena correlación en la evaluación de dietas comerciales para camarón, pero el número de dietas utilizadas fue menor (3 o 4). Se requieren mas estudios para confirmar estos resultados y poder extender el uso de este método para el control de calidad de los alimentos.

Hasta el momento el método de pH-Stat con enzimas de camarón es un indicador confiable para la digestibilidad proteica de HP para camarón con un contenido de ceniza por debajo del 15%.

9.5 Determinación de la digestibilidad con pepsina (A.O.A.C., Torry modificado)

Los valores encontrados para la digestibilidad de las HP con pepsina, utilizando el método A.O.A.C., Torry modificado se presentan en la Tabla 14. Los valores encontrados son muy bajos y no se comparan con los encontrados para HP por varios autores (Anderson *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1994) excepto con el estudio de Clancy *et al.* (1995). Además, la desviación estándar de algunas de las muestras es muy alta, haciendo necesario un gran número de replicados.

La diferencia entre los resultados obtenidos en la digestibilidad con pepsina con respecto a los de la literatura, pueden ser debido a que la concentración de enzima utilizada en los otros estudios fue mas alta, también es posible que la actividad declarada de la enzima puesta en el recipiente, no fuera la actividad real de la enzima.

El utilizar menor concentración puede llevar a resultados un poco mas bajos, pero hace al método más sensible. Es posible que el método utilizado por otros autores no era Torry modificado o que el blanco fue desechado. Cuando se utilizan concentraciones más altas de enzima como lo prescribe el AOAC, los resultados muestran mas altas digestibilidades ya que se digiere todo, incluyendo la proteína de baja calidad.

Estudios sobre la reproducibilidad del análisis, utilizando la misma harina de pescado pero analizada en 5 diferentes laboratorios (Pike, comunicación personal), dieron coeficientes de variación hasta de 6,7% y las diferencias de las HP individuales eran tan altas como 9.2%. Estas diferencias se atribuyen a varias causas tal como las condiciones de almacenamiento ej. temperatura, rancidez de los lípidos o humedad, tamaño de la partícula después de moler, el método de agitación usado y la concentración de la enzima.

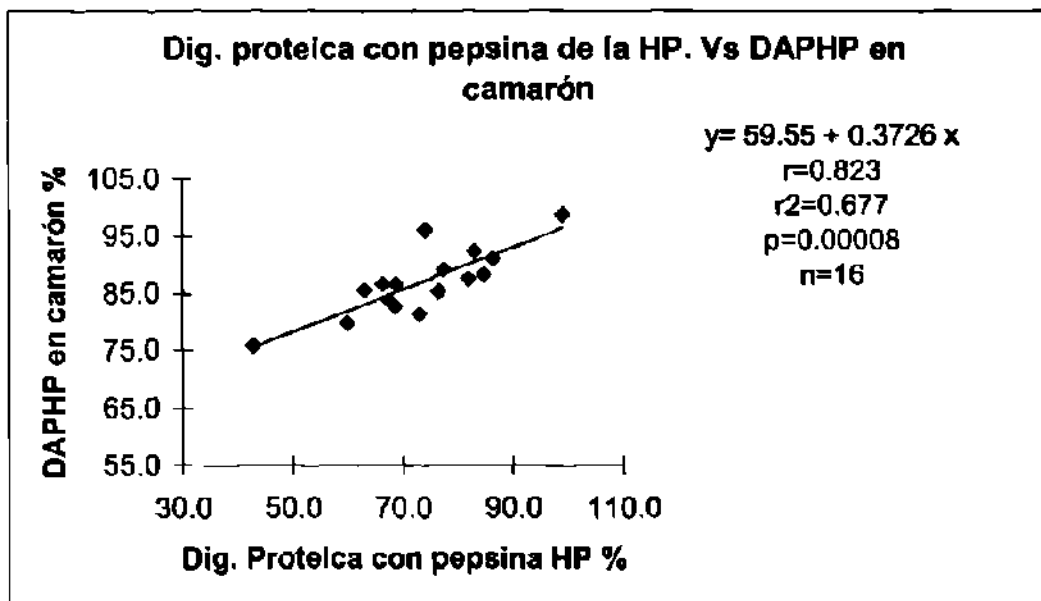
Tabla 14. Digestibilidad de las harinas de pescado y dietas utilizando pepsina diluida (método AOAC, Torry modificado), sin corrección por la proteína soluble en ácido.

% Proteína	HP	Dietas	Digestibilidad de la dieta (%)	Desviación estándar	Digestibilidad de la harina (%)	Desviación estándar
74.8	815	12	82.70 fgh	2.03	86.31 f	1.96
74.2	539	6	74.66 cdef	5.82	84.67 f	1.83
74.0	163	1	62.67 a	4.15	42.69 a	0.73
73.5	csp	2	80.76 efgh	0.73	98.91 g	0.02
73.0	813	10	77.27 defg	0.72	74.09 cde	0.92
72.1	2204	7	71.32 bcd	2.57	59.95 b	0.00
72.1	TAF	11	84.91 ghi	0.06	81.87 ef	2.08
70.4	11858	5	64.08 ab	1.61	68.68 bcd	0.34
70.1	1986	8	91.14 i	2.37	73.02 cde	5.82
69.6	Fresca	15	73.14 cde	3.00	63.00 b	2.68
69.2	1431	13	85.72 hi	1.63	82.99 ef	1.17
68.4	2002	4	74.18 cde	4.63	68.58 bcd	1.18
72.1	Tepual	17	78.48 defgh	0.15	81.19 ef	5.35
67.7	Moderad	16	68.93 abc	9.19	66.30 bc	0.74
	a					
65.8	Descompuesta	14	83.85 ghi	3.80	77.41 def	5.45
64.2	3664	3	80.19 efgh	0.99	67.30 bcd	2.70
63.6	3481	9	79.22 defgh	0.68	76.49 def	14.10

Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan $p=0.05$).

La Figura 6 muestra una regresión lineal significativa entre la digestibilidad con pepsina (no corregida) y la digestibilidad aparente de la proteína en camarón ($r^2=0.67$, $p=0.00008$, $n=16$). Tomando en cuenta los coeficientes de correlación encontrados para la digestibilidad *in vivo* en camarón y la digestibilidad *in vitro* con pepsina, la digestibilidad con pepsina generalmente dio buena correlación con los otros métodos de determinación de la digestibilidad en camarón. A partir de los coeficientes de correlación que presentaban probabilidades de $p<0.05$, se calculó la ecuación de regresión correspondiente. En la tabla 15 se muestra la aplicación de esta ecuación para predecir la DAPHP a partir de la digestibilidad con pepsina.

Figura 6.- Regresión lineal entre la digestibilidad *in vitro* con pepsina diluida (sin corrección por



proteína soluble) y la digestibilidad *in vivo* (DAPHP).

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 * Digcon peps.)

Harina	DAPHP (%)	Dig Con pepsina de HP (%)	Predicción de DAPHP (%)	Residuos
F815	91.02	86.31	91.71	-0.69
539/93	88.22	84.67	91.10	-2.88
163/94	75.84	42.69	75.45	0.39
CPSP	98.74	98.91	96.40	2.34
F813	95.98	74.09	87.15	8.82
2204	79.82	59.95	81.88	-2.07
TAF-1	87.47	81.87	90.05	-2.58
11858	86.46	68.68	85.14	1.32
1986	81.21	73.02	86.75	-5.55
FRESCA	85.55	63.00	83.02	2.53
1431	92.20	82.99	90.47	1.73
2002	82.61	68.58	85.10	-2.49
MODERADA	86.49	66.30	84.25	2.24
DESCOMP	88.96	77.41	88.39	0.57
UESTA				
3664	83.71	67.30	84.62	-0.92
A3481	85.27	76.49	88.05	-2.78

La tabla 16 muestra que si se corrigen los valores por solubilidad en ácido, son un poco más bajos. Se encontró que la solubilidad de la proteína en una solución ligeramente ácida es tan alta como 57% para el CPSP, mientras que la más baja fue de 12,8% para la HP 163/ 94 y el promedio estaba entre 15 y 20%. La hidrólisis-ácida (sin enzima) por consiguiente juega una parte importante en la digestión de proteína usando este método. Cuando se compararon ambos resultados de digestibilidad con pepsina, corregidos y sin corregir, se encontró que usando los valores sin corregir, la correlación con el estudio *in vivo* era mucho mejor. Esto puede ser explicado porque en ambos casos (digestibilidad *in vivo* e *in vitro* con pepsina), la proteína soluble da una sobreestimación de la digestión enzimática, sobre todo para las HP con un alto contenido de proteína soluble.

Tabla 16. Digestibilidad de la harina de pescado utilizando el método de pepsina corregida por la solubilidad de la proteína en ácido.

Dieta (HP)	Proteína cruda en HP %	Harina de pescado	Digestibilidad con pepsina (%)	DE
12 (F815)	74.80	F815	79.23	2.97
6 (539/93)	74.20	539/93	79.65	2.43
1 (163/94)	74.00	163/94	25.55	0.95
2 (CPSP)	73.50	CPSP	91.73	0.13
10 (F813)	73.00	F813	39.07	2.16
7 (2204)	72.10	2204	34.24	0.00
11 (TAF-1)	72.10	TAF-1	72.63	3.14
5 (11858)	70.40	11858	50.35	0.53
8 (1986)	70.10	1986	60.63	8.50
15 (Fresca)	69.6	Fresca	47.51	3.80
13 (1431)	69.20	1431	70.75	2.01
4 (2002)	68.43	2002	53.3	1.76
16 (Moderada)	67.70	Med.	47.51	1.15
14 (Descompuesta)	65.80	Descompuesta	66.66	8.04
3 (3664)	64.20	3664	41.57	4.82
9 (A3481)	63.60	A3481	65.09	20.93
17 (Tepual)	72.13	Tepual	71.91	7.99

En la tabla 17 se compara la correlación entre la DAPHP en camarón y la digestibilidad *in vitro* con pepsina diluida (AOAC Torry modificada) o con enzimas de camarón (pH-Stat), y la solubilidad de la HP en ácido débil. No se esperaba que la digestibilidad con pepsina diera una correlación tan buena con la digestibilidad *in vivo*. Se encontró que era igual o mejor que el método del pH-Stat usando enzimas específicas. La correlación significativa de la DAPHP con la solubilidad de la proteína en ácido débil parece confirmar la razón de porqué se correlaciona mejor con la digestibilidad con pepsina no corregida que con la corregida. La correlación entre la

digestibilidad con pepsina y la DAPHP no se modificó al excluir las HP con baja proteína/ alta ceniza de la base de datos; en contraste la correlación entre el DH y la DADHP aumentó fuertemente y se incrementó la significancia al omitir estas harinas de pescado (n= 14).

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.

	HP	pH-stat en camarón		Pepsina diluida (no corregida)		Proteína soluble	
	n	r	P	r	P	r	P
DAPHP camarón	16	0.44	0.089	0.82	0.00001	0.72	0.002
DAPHP camarón	14	0.80	0.001	0.83	0.00001	0.73	0.003
DAPHP camarón	7	0.88	0.010	0.86	0.012	0.76	0.048

n = 16 : todas las harinas de pescado

n = 14: omitiendo las harinas con proteína < 65% y ceniza > 15%

n = 7: solo las harinas de pescado con proteína > 72% y ceniza < 12%

El DH tiene una mejor correlación con la digestibilidad con pepsina cuando se excluyen estas harinas de pescado de bajo contenido proteico (n= 14 o n= 7 en Tabla 18).

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.

	HP	Pepsina diluida		Proteína soluble	
	n	r	P	r	P
pH-stat en camarón	17	0.40	0.107	0.53	0.028
pH-stat en camarón	14	0.79	0.001	0.76	0.002
pH-stat en camarón	7	0.81	0.026	0.82	0.023

n = 17 : Todas las harinas de pescado + Tepual

n = 14: omitiendo las harinas con proteína < 65% y ceniza > 15%

n = 7: solo las harinas de pescado con proteína > 72% y ceniza < 12%

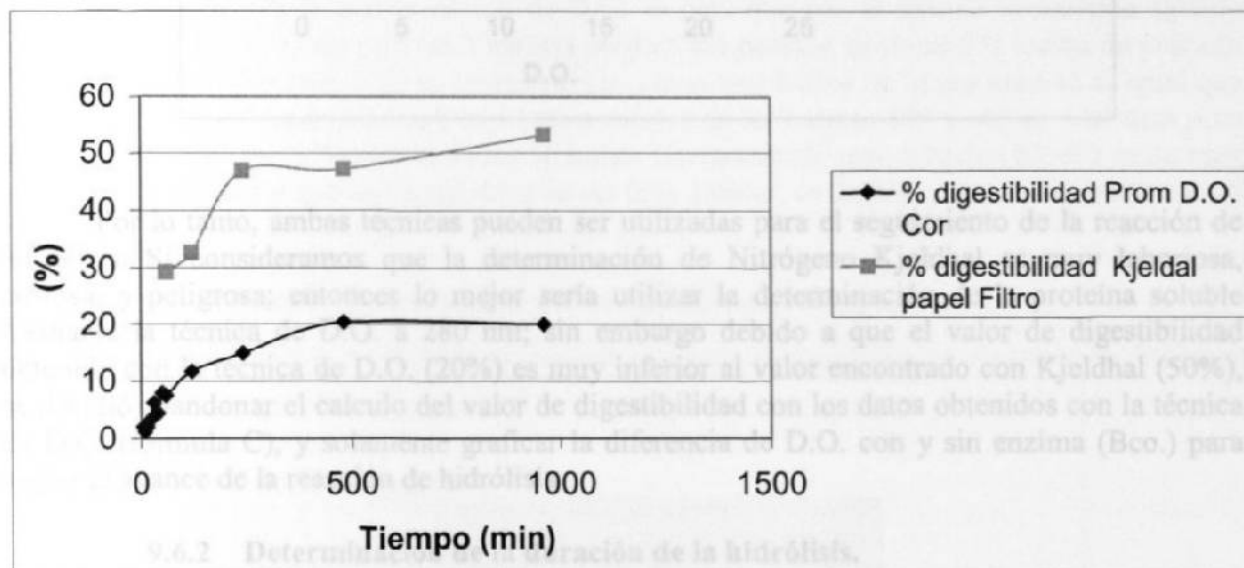
9.6 Determinación de la digestibilidad *in vitro* con tripsina bovina (Tipo A.O.A.C.).

9.6.1 Determinación de los productos de reacción o del sustrato residual (control de la Hidrólisis)

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos de digestibilidad de la harina de pescado Tepual determinados mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm en muestras obtenidas a los diferentes períodos de tiempo, utilizando Tripsina bovina al 0.0005%. La digestibilidad se determinó con la Fórmula C (ver material y método 8.2.3.4)

Los resultados obtenidos de digestibilidad de la harina de pescado Tepual determinados mediante el método de Kjeldhal en muestras obtenidas a los diferentes períodos de tiempo, utilizando Tripsina bovina al 0.0005% se muestran en la misma figura 7. La digestibilidad se determinó con la Fórmula A (ver material y método 8.2.3.4).

Figura 7.- Digestibilidad de la harina de pescado Tepual con Tripsina Bovina 0.0005%

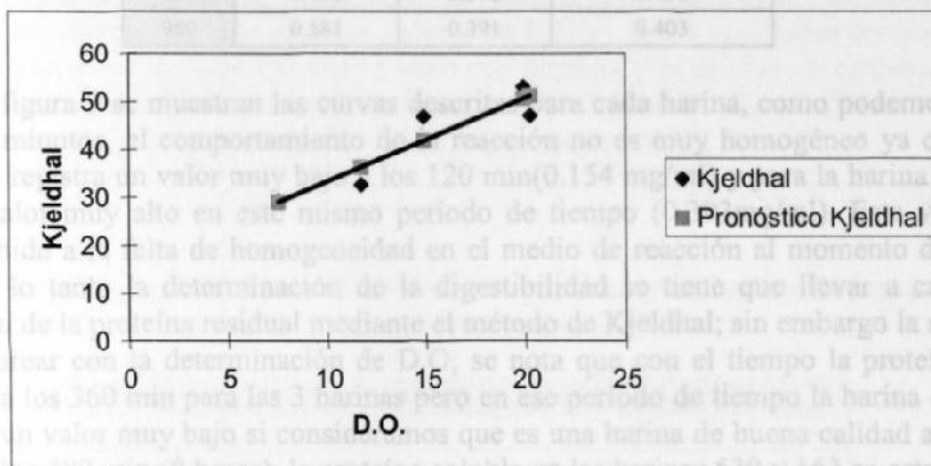


Como podemos notar, con la concentración de tripsina utilizada (0.0005%) la hidrólisis de la harina fue muy homogénea, alcanzando el mayor % de digestibilidad a los 16 horas (960min) en el caso del método Kjeldhal y a los 8 h (480 min) en el caso de medir la densidad óptica. Si comparamos los resultados obtenidos con ambas técnicas, podemos notar que se obtiene un valor de digestibilidad mayor con la determinación Kjeldhal que con la determinación a partir de D.O., siendo de 50% y 20% en promedio respectivamente. No es claro porque la

cantidad de proteína insoluble que desaparece (medido con Kjeldhal) es mayor a la cantidad de proteína soluble formada (medido con D.O.)

Una explicación sería que la tirosina y otros aminoácidos aromáticos (detectados por absorción a 280 nm) sean destruidos en la fase soluble del medio de reacción, lo que parece poco probable. Sin embargo al realizar la determinación del coeficiente de regresión, entre los resultados de ambas técnicas este fue aceptable ($r^2 = 0.85$) con una ecuación de predicción $Y = 15.7 + 1.75 X$ y una $P = 0.024$ (figura 8).

Figura 8.- D.O. Curva de regresión ajustada



Por lo tanto, ambas técnicas pueden ser utilizadas para el seguimiento de la reacción de hidrólisis. Si consideramos que la determinación de Nitrógeno Kjeldhal es muy laboriosa, costosa, y peligrosa; entonces lo mejor sería utilizar la determinación de la proteína soluble mediante la técnica de D.O. a 280 nm; sin embargo debido a que el valor de digestibilidad obtenido con la técnica de D.O. (20%) es muy inferior al valor encontrado con Kjeldhal (50%), se decidió abandonar el cálculo del valor de digestibilidad con los datos obtenidos con la técnica de D.O. (fórmula C), y solamente graficar la diferencia de D.O. con y sin enzima (Bco.) para seguir el avance de la reacción de hidrólisis.

9.6.2 Determinación de la duración de la hidrólisis.

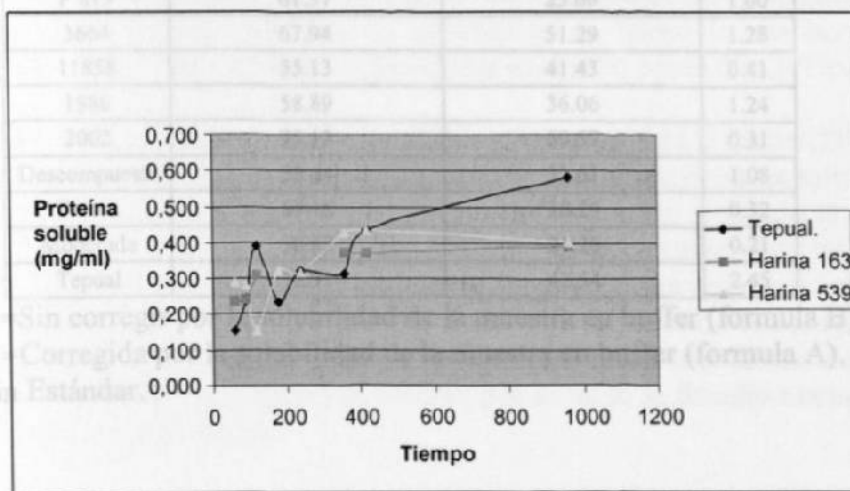
Para determinar el tiempo óptimo para detener la reacción, se monitorearon 3 diferentes harinas de pescado (las cuales presentaban diferencias de digestibilidad *in vivo*) mediante la determinación de la proteína soluble con la técnica de D.O. a 280 nm. Para esta determinación (Tabla 19) no se utilizó la fórmula C; solamente se determinó la diferencia entre la proteína soluble de la harina menos la proteína soluble en el blanco (es decir proteína soluble en buffer sin adición de enzima).

Tabla 19.- Resultados de proteína solubilizada en mg/ml (D.O. 280nm) a diferentes tiempos en 3 Harinas de pescado.

Tiempo (min)	Prot. de la Muestra – Prot. Del Bco (mg/ml).		
	Tepual.	Harina 163	Harina 539
60	0.153	0.239	0.289
90	0.236	0.240	0.280
120	0.393	0.309	0.154
180	0.235	---	0.322
240	0.322	---	0.315
360	0.313	0.371	0.426
480	0.435	0.372	0.436
960	0.581	0.391	0.403

En la figura 9 se muestran las curvas descritas para cada harina, como podemos notar en los primeros minutos, el comportamiento de la reacción no es muy homogéneo ya que para la harina 539 se registra un valor muy bajo a los 120 min (0.154 mg/ml) y para la harina Tepual, se registra un valor muy alto en este mismo período de tiempo (0.393mg/ml). Esta variabilidad puede ser debida a la falta de homogeneidad en el medio de reacción al momento de tomar la muestra; por lo tanto la determinación de la digestibilidad se tiene que llevar a cabo con la determinación de la proteína residual mediante el método de Kjeldhal; sin embargo la reacción se puede monitorear con la determinación de D.O; se nota que con el tiempo la proteína soluble aumenta hasta los 360 min para las 3 harinas pero en ese periodo de tiempo la harina de pescado Tepual tiene un valor muy bajo si consideramos que es una harina de buena calidad al igual que la 539/93. A los 480 min (8 horas), la proteína soluble en las harinas 539 y 163 se estabiliza pero sigue aumentando en la Tepual hasta las 16 horas. Considerando que la harina 539/93 es de muy buena digestibilidad y que la Tepual debe de ser muy similar, se decidió parar la digestión a las 8 horas.

Figura 9.- determinación del tiempo de duración de la hidrólisis.



9.6.3 Evaluación de la digestibilidad *in vitro* para las diferentes harinas de pescado.

Los resultados de digestibilidad *in vitro* con tripsina de las diferentes harinas de pescado obtenidos con el método establecido corrigiendo o no por la solubilidad propia de la muestra en el buffer se muestran en la tabla 20, los cuales van de 50.82 a 95.13 % para la digestibilidad no corregida (formula B) y de 19.72 a 73.75 % para la digestibilidad corregida (formula A). Como podemos notar si utilizamos la Fórmula A los resultados son mas bajos que con la Formula B, lo cual es lógico ya que se elimina la parte de la proteína soluble, esto mismo sucede al utilizar la pepsina (ver capítulo anterior); sin embargo, al realizar la correlación de los resultados de digestibilidad proteica *in vitro* con tripsina contra la digestibilidad proteica *in vivo*, los resultados no fueron los esperados ya que la r^2 fue de 0.042 para la digestibilidad B y de $r^2=0.18$ para la digestibilidad A (corregida por la proteína soluble en buffer). Estos resultados contrastan con la buena correlación entre la digestibilidad *in vitro* con pepsina y la *in vivo* en camarón, y con el hecho de obtener una mejor correlación cuando los resultados de digestibilidad *in vitro* con pepsina no están corregidos por la solubilidad de la proteína en ácido.

Tabla 20.-Digestibilidad proteica *in vitro* con tripsina de las harinas de pescado (determinación de proteína residual Kjeldhal).

Harina	Digestibilidad B (%)	Digestibilidad A (%)	D.E.
539	55.59	73.75	2.36
163	68.50	24.54	2.01
CPSP	59.23	43.22	2.55
A 3481	58.71	46.95	1.29
TAF	72.25	19.72	0.58
1431	69.91	57.28	0.21
2204	60.96	26.83	2.52
F 813	75.50	51.66	1.48
F 815	61.37	25.66	1.00
3664	67.94	51.29	1.28
11858	55.13	41.43	0.41
1986	58.89	36.06	1.24
2002	95.13	60.57	0.31
Descompuesta	55.64	33.61	1.08
Fresca	55.16	38.29	0.32
Moderada	50.82	21.20	0.21
Tepual	55.91	42.54	2.45

Digestibilidad B =Sin corregir por la solubilidad de la muestra en buffer (formula B).

Digestibilidad A =Corregida por la solubilidad de la muestra en buffer (formula A).

D.E. = Desviación Estándar.

Por otro lado, los resultados de la determinación de proteína soluble mediante la D.O. a 280nm de cada una de las diferentes harinas de pescado a los 8 horas, se sometieron a un análisis de correlación con los valores de la digestibilidad *in vivo* pero no se obtuvieron buenos resultados ya que la r^2 fue solo de 0.018.

9.7 Determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (Tipo A.O.A.C.).

Las curvas de hidrólisis para las harinas de pescado a 24 horas utilizando el extracto enzimático de hepatopáncreas se muestran en la figura 10. Como podemos observar, aunque hay algunas harinas en donde las curvas tienen ligeras caídas entre los diferentes tiempos sucesivos (F813, 2002 y Tepual) por lo general, las harinas se mantienen en la misma posición es decir, la F813 es siempre la que posee el valor mas alto y la 3664 el valor mas bajo; estas caídas se pueden deber a que al momento de tomar las alícuotas la muestra no estaba suficientemente homogénea.

Generalmente con el transcurso del tiempo los valores de proteína soluble aumentan encontrándose el valor mas alto a las 2 horas (120min) para luego mantenerse mas o menos constantes con ligeras variaciones, sin embargo, para algunas harinas como la 11858 y la 2204 hay un aumento entre las 4 y 6 horas y para el CPSP, la 2002, Descompuesta, Médiun y 163, hay un aumento ligero entre las 6 y 24 horas, por ello se decidió realizar las digestiones a los dos periodos de tiempo. Lan and Pan (1993) al utilizar extractos de glandula digestiva de *P. monodon*, para hidrolizar diferentes ingredientes (white fish meal, brown fish meal, etc.) mencionan que 4 horas de digestión no son suficientes para digerir completamente las harinas, en nuestro caso, sigue habiendo hidrólisis a 6 horas y en algunos casos hasta las 24 horas.

La harina 3664 presenta valores de proteína soluble por debajo o cercanos a cero cuando se determina A_{280} , probablemente debido a que posee un bajo contenido de tirosina y triptofano ya que como menciona Parsons (sin año) el incremento de hueso en las harinas con alto contenido de ceniza las hace deficientes en aminoácidos azufrados como Cys y Trp.

La figura 11.- muestra las curvas de hidrólisis a 24 horas para 3 dietas (D1, D6 y D17). Así como para las harinas, con el transcurso del tiempo los valores de proteína soluble aumentan, encontrándose el valor mas alto a las 6 horas (360 min) para luego mantenerse mas o menos constantes excepto para la harina Tepual, la cual alcanza el mayor valor hasta las 24 horas. Sin embargo, considerando que esta dieta tiene un contenido de proteína muy bajo en comparación con el resto (30.4 vs 40% en promedio), y que por lo tanto se requiere de una mayor cantidad de muestra para completar los 6.25 mg de proteína/ml la relación enzima-sustrato es menor y tal vez es por esto que la hidrólisis se lleve mas tiempo; por lo tanto se decidió mantener el tiempo de digestión en 6 horas para las dietas.

Figura 10.- Curvas de hidrólisis para las harinas de pescado a 24 horas

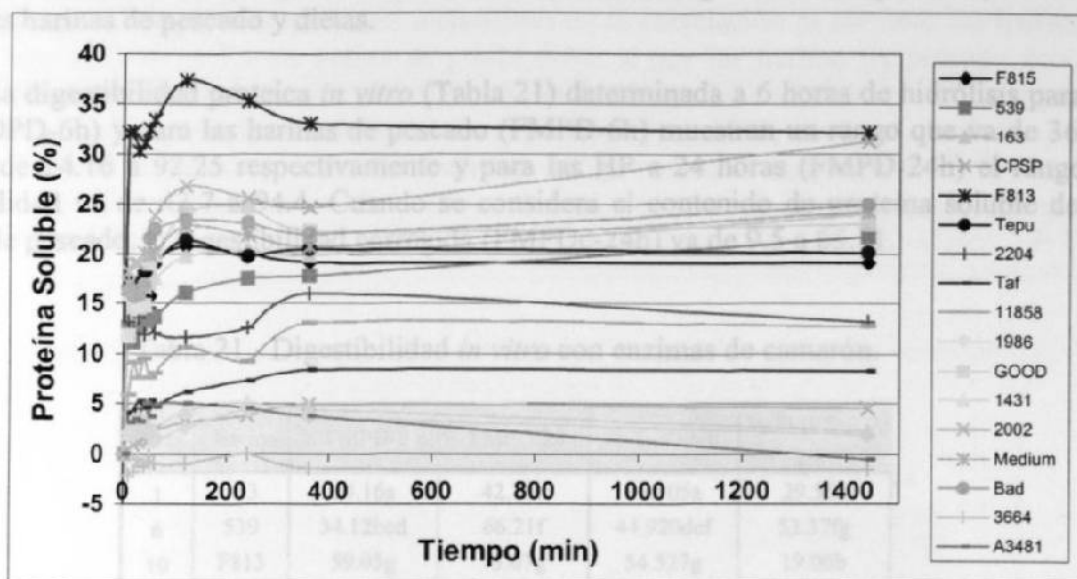
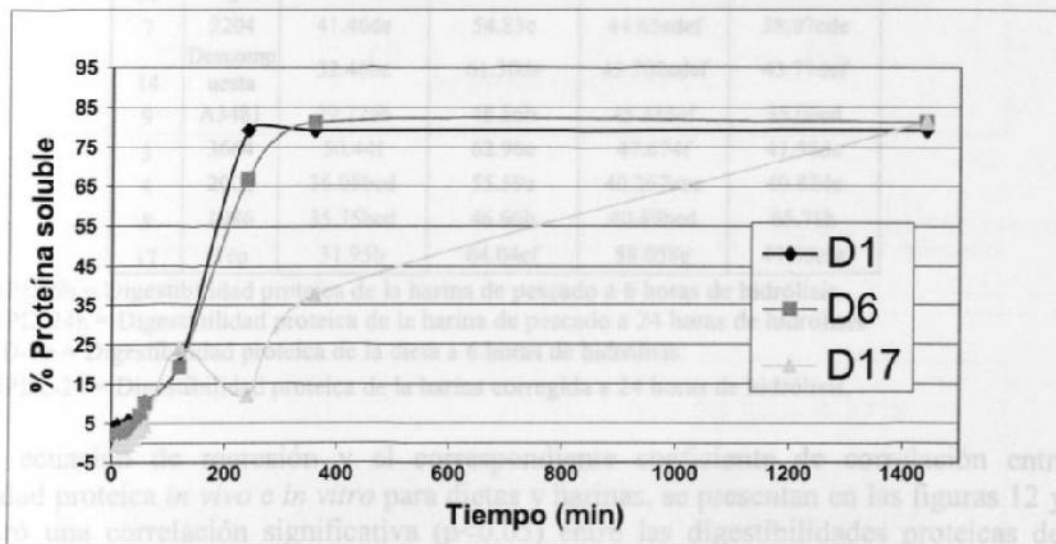


Figura 11.- Curvas de hidrólisis para las dietas a 24 horas



Los valores encontrados para la digestibilidad *in vitro* con un homogeneizado de camarón se encuentran en la tabla 21. Se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes harinas de pescado y dietas.

La digestibilidad proteica *in vitro* (Tabla 21) determinada a 6 horas de hidrólisis para las dietas (DPD-6h) y para las harinas de pescado (FMPD-6h) muestran un rango que va de 36.8 a 64.16 y de 24.16 a 92.25 respectivamente y para las HP a 24 horas (FMPD-24h) el rango de digestibilidad va de 42.7 a 94.4. Cuando se considera el contenido de proteína soluble de las harinas de pescado, la digestibilidad corregida (FMPDc-24h) va de 9.5 a 65.71.

Tabla 21.- Digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón.

Dieta	Harina	% FMPD-6 h	% FMPD-24 h	% DPD-6 h	% FMPDc-24 h
1	163	24.16a	42.70a	36.805a	29.55c
6	539	34.12bcd	66.21f	44.920def	53.37fg
10	F813	59.03g	73.07g	54.527g	19.06b
12	F815	45.88f	70.50g	46.964f	9.49a
5	11858	35.83bcd	55.66c	41.321bcde	40.03cde
11	TAF	38.70cd	59.28d	43.923cdef	45.05def
2	CPSP	92.11h	94.42h	64.164h	56.75gh
13	1431	44.66ef	66.96f	44.061cdef	53.54fg
15	FRESCA	33.74bcd	55.98c	39.153ab	42.66def
16	Moderada	39.74de	58.85cd	41.602bcde	45.25def
7	2204	41.46de	54.83c	44.65cdef	38.07cde
14	Descompuesta	32.46bc	61.30de	43.702cdef	43.71def
9	A3481	29.72ab	48.86b	45.488ef	35.06cd
3	3664	50.44f	62.96e	47.674f	41.58de
4	2002	36.08bcd	55.59c	40.267abc	40.82de
8	1986	35.75bcd	46.66b	40.89bcd	65.71h
17	Tep	31.95b	64.04ef	58.058g	47.00efg

FMPD-6h = Digestibilidad proteica de la harina de pescado a 6 horas de hidrólisis.

FMPD-24h = Digestibilidad proteica de la harina de pescado a 24 horas de hidrólisis.

DPD-6h = Digestibilidad proteica de la dieta a 6 horas de hidrólisis.

FMPDc-24 = Digestibilidad proteica de la harina corregida a 24 horas de hidrólisis.

La ecuación de regresión y el correspondiente coeficiente de correlación entre la digestibilidad proteica *in vivo* e *in vitro* para dietas y harinas, se presentan en las figuras 12 y 13. Se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) entre las digestibilidades proteicas de las dietas *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.77$, $r^2 = 0.6$, $p = 0.0005$, $n = 16$) así como entre las digestibilidades proteicas de la harina *in vivo* e *in vitro* a 6 y 24 horas de hidrólisis (figura 14) ($r = 0.74$, $r^2 = 0.54$, $p = 0.001$, $n = 16$ y $r = 0.89$, $r^2 = 0.8$, $p = 0.000003$, $n = 16$ respectivamente).

Estas dos últimas correlaciones mejoran cuando no se consideran las harinas de pescado de mas de 14.5% de ceniza (figuras 15 y 16) ($r=0.8$ $r^2=0.64$, $p=0.0017$, $n= 12$ y $r=0.93$, $r^2=0.86$, $p=0.00001$, $n= 12$ respectivamente). El incremento en la correlación al eliminar las harinas de pescado con mas de 14.5% de ceniza se puede deber a que las harinas de pescado con alto contenido de ceniza probablemente por que reducen la disponibilidad al ataque de la digestión con tripsina, sobre los aminoácidos básicos (Lan y Pan 1993) lo cual también ocurre probablemente en el método *in vitro*. Sin embargo se han reportado adaptaciones de la actividad enzimática en el hepatopáncreas de camarones peneidos por el ayuno, el tamaño de los organismos, la fuente de proteína de la dieta y el nivel de proteína (Carrillo y González, 1998).

Figura 12.- Correlación entre digestibilidad *in vitro* de las dietas a 6 horas de hidrólisis y la digestibilidad proteica *in vivo* de las dietas.

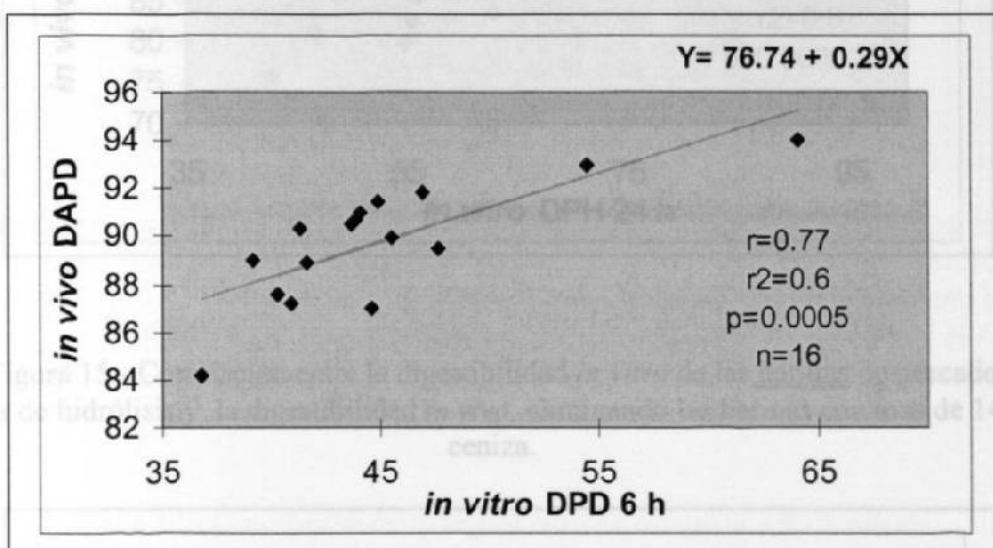


Figura 13.- Correlación entre la digestibilidad *in vitro* de las harinas de pescado a 6 horas de hidrólisis y la digestibilidad *in vivo*

