

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CONTRIBUCIONES PARA EL ESTUDIO DEL REQUERIMIENTO DE
METIONINA EN JUVENILES DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

Por

LUIS MARTÍNEZ ROCHA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biotecnología

Enero, 2012

CONTRIBUCIONES PARA EL ESTUDIO DEL REQUERIMIENTO DE
METIONINA EN JUVENILES DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

Comité de Tesis

Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez
Director de Tesis

Dra. Martha G. Nieto López
Secretario

Dr. Denis Ricque Marie
Vocal

Dra. Mireya Tapia Salazar
Vocal

Dr. José María Viader
Vocal

Sub-Director de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo doctoral, si bien ha implicado el esfuerzo y la dedicación de su autor, refleja las contribuciones de un sin número de personas; que en mayor o menor escala, que en cuestiones humanas, técnicas o económicas, han otorgado soporte tanto al autor, como al trabajo en sí. El enriquecimiento del autor es razón suficiente para agradecer a todas y cada una de estas personas en los párrafos siguientes.

Los sólidos principios de este autor merecen un agradecimiento especial a su familia. A su mamá Elisita, el cimiento de su vida. A sus padres, quienes inspiran una superación continua y le han brindado herramientas para ello. A sus tíos, primos y demás, quienes le han abrigado en su estadía en Monterrey. A Eliazar Martínez, un soporte fundamental en su formación. Así como a todos aquellos que me han aceptado recientemente como parte de su familia (Meneses o Silva).

Es necesario agradecer la adecuada instrucción de la Dra. Cruz-Suárez, Directora de la presente tesis de doctorado; así como el continuo seguimiento e instrucción de la Dra. Nieto-López, la Dra. Tapia-Salazar, el Dr. Ricque-Marie y el Dr. Viader asesores del trabajo. Sin embargo se debe hacer mención de otros colaboradores del Laboratorio de Maricultura, que con su asesoramiento e intervención fortalecieron al autor y el trabajo realizado, como el Dr. Gamboa-Delgado, el Dr. Villareal-Cavazos, los laboratoristas Claudio Barbosa y Julio Beltrán, además de Adriana García. Debo agradecer la colaboración y aptitudes que me deja el haber trabajado con diferentes grupos de voluntarios, becarios y estudiantes de pregrado.

Se les agradece a los investigadores que ajenos a este proyecto han prestado recursos o su asesoramiento; a los Drs. Andreas Lemme, Dominique Bureau, Jorge Kawas y la M.C. Dinora Pérez.

Se les agradece a todas las instituciones públicas y del sector privado que colaboraron en el desarrollo del presente estudio. Al Consejo Nacional de Ciencia y

Tecnología por el sustento económico del autor. A fundación Telmex por la capacitación continua del autor. A Novus Internacional, México por el material y los análisis químicos otorgados. A Evonik-Degussa por los materiales, los análisis y la colaboración prestada. A Bentolli Agrinutrition por el material brindado. A las empresas Grupo Maricultura del Pacífico y Aquanopolis, por los organismos suministrados. A la empresa Costamar por los organismos e ingredientes suministrados.

El agradecimiento es un acto meritorio, que me honra reconocer; en palabras de Francois de La Rochefoucauld, “no es más que la secreta esperanza de recibir beneficios nuevos y mayores”; en mi sentir “no es más que la cálida remembranza de beneficios pasados, glorias venideras y la fragilidad del individuo en una organización social”.

PÁGINA DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada con todo amor y cariño a mi esposa Alejandra Meneses y a mi hija, recién nacida Isis. Quisiera haber pasado más meses junto a ustedes.

Gracias, Ale, por darme tu apoyo incondicional, por enseñarme a vivir. Mi amor y admiración hacia tu persona, me han dado la fuerza y dedicación necesarias para terminar este trabajo.

Isis, tú has sido la inspiración para finalizar este trabajo, aunque no lo dejarás de ser en adelante.

LITERATURA DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS

Parte del presente trabajo ha sido presentada en forma de cartel en los siguientes congresos:

MARTÍNEZ-ROCHA, L., GAMBOA-DELGADO, J., RICQUE-MARIE, D., NIETO-LÓPEZ, M. & CRUZ-SUÁREZ, L. E. 2011 Incorporación de Nitrógeno Dietario de las Harinas de Chicharo y de Pescado en el Músculo del Camarón Blanco *L. vannamei*. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., NIETO-LOPEZ, M., VILLAREAL-CAVAZOS, D., GAMBOA-DELGADO, J. & HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, L., eds. *Avances en Nutrición Acuícola XI. Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23-25 de Noviembre Tlalnepantla, Estado de México, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 83.

MARTÍNEZ-ROCHA, L., NIETO-LÓPEZ, M., TAPIA-SALAZAR, M., RICQUE-MARIE, D. & CRUZ-SUÁREZ, L. E. 2010 Efecto de la Adición de Metionina y Lisina a un Alimento a Base de Soya-Trigo Sobre el Rendimiento de Camarón Blanco *L. vannamei* In: CRUZ-SUAREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., NIETO-LÓPEZ, M. G., VILLARREAL-CAVAZOS, D. A. & GAMBOA-DELGADO, J., eds. *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola San Nicolás de los Garza, N. L., México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 94.

MARTÍNEZ-ROCHA, L., NIETO-LÓPEZ, M., TAPIA-SALAZAR, M., RICQUE-MARIE, D. & CRUZ-SUÁREZ, L. E. 2010 Efecto del Post-acondicionamiento Sobre la Hidroestabilidad y la Digestibilidad de una dieta a Base de Chicharo y Soya en Camarón *L. vannamei* In: CRUZ-SUAREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., NIETO-LÓPEZ, M. G., VILLARREAL-CAVAZOS, D. A. & GAMBOA-DELGADO, J., eds. *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola San Nicolás de los Garza, N. L., México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 95.

Adicionalmente se ha publicado en:

MARTÍNEZ-ROCHA, L., GAMBOA-DELGADO, J., NIETO-LÓPEZ, M., RICQUE-MARIE, D. & CRUZ-SUÁREZ, L. E. 2012. Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquaculture Research*, 1-13.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	34
2. HIPOTÉISIS	36
2.1 Hipotéisis General.....	36
2.2 Hipotéisis Particulares.....	36
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo General.....	39
3.2 Objetivos Particulares	39
4. ANTECEDENTES	42
4.1 Generalidades.....	42
4.2 Balance de Aminoácidos.....	44
4.2.1 Requerimientos Cualitativos de Aminoácidos en Crustáceos.....	44
4.2.2 Ingredientes Típicos y Formulaciones Comerciales Clásicas.	45
4.2.3 Ingredientes Alternos y su Relación Costo-Beneficio en el Alimento.....	46
4.2.4 Otras Problemáticas Asociadas a la Utilización de Fuentes de Proteína Vegetal	48
4.3 Métodos Para Determinar el Requerimiento de Aminoácidos	49
4.3.1 Proteínas de Referencia Para el Estudio de Aminoácidos en Crustáceos	49

4.3.2	Análisis del Perfil de Aminoácidos del carcas	50
4.3.3	Modelos Factoriales (Acreción de Aminoácidos en el camarón).....	53
4.3.4	Modelos de Dosis-Respuesta.....	53
4.3.5	Modelos a Base de la Técnica de Dilución de Dietas.	55
4.4	Fuentes de Aminoácidos Empleadas en Estudios de Requerimientos.....	55
4.4.1	Utilización de Aminoácidos Libres en Dietas Puras	55
4.4.2	Utilización de Aminoácidos Encapsulados	56
4.4.3	Aminoácidos Ligados Covalentemente.....	57
4.4.4	Utilización de proteínas integraas	58
4.5	Estudios previos en el requerimiento de Met en camarones penaeidos.....	58
4.6	Dietas Preliminares Usadas Para Determinar el Requerimiento de Metionina	59
5.	MATERIAL Y MÉTODO	62
5.1	Productos Evaluados.....	64
5.1.1	MHA® (methionine hidroxy analog, calcium)	64
5.1.2	DL-metionina	65
5.1.3	L-Lys-HCl (lisina mono hidro-clorada)	66
5.1.4	Encapsulados en agar	67
5.1.5	Encapsulados en CMC	68
5.2	Ingredientes usados como principal fuente de proteína en las dietas control deficientes en Met.....	68
5.2.1	Pasta de soya y aislado de soya	68
5.2.2	Harina de trigo.....	69
5.2.3	Harina de Chícharo.....	69
5.2.4	Harina de pescado	70
5.3	Fabricación y Formulación de Dietas	73

5.3.1 Dietas del efecto de Hidroxi análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente (Experimento 1).....	73
5.3.2 Dietas del Efecto de Hidroxi análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente (Experimento 2).....	74
5.3.3 Dietas del efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)	76
5.3.4 Dietas del experimento 4.....	77
5.3.5 Dietas del efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5).....	78
5.3.6 Dietas del efecto de Sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6)	80
5.3.7 Dietas de los experimentos 7 y 8.....	82
5.3.8 Dietas del efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)	84
5.3.9 Dietas del efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de <i>L. vannamei</i> (Experimento 10).....	84
5.3.10 Dietas de contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de <i>L. vannamei</i> (Experimento 11).....	85
5.4 Análisis Químicos.....	86
5.5 Análisis Físicos	88
5.6 Animales de Experimentación	89
5.6.1 Efecto de hidroxi análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente (Experimento 1)	89
5.6.2 Efecto de hidroxi análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente (Experimento 2)	90
5.6.3 Perfil de AA de carcas de <i>L. vannamei</i> como patrón de referencia (Experimento 4)	90

5.6.4 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)	91
5.6.5 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios (Experimento 7)	91
5.6.6 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en jaulas (Experimento 8)	92
5.6.7 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)	92
5.6.8 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de <i>L. vannamei</i> (Experimento 10)	92
5.6.9 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de <i>L. vannamei</i> (Experimento 11)	93
5.7 Condiciones Experimentales.....	93
5.8 Diseño Experimental, variables evaluadas y análisis estadístico.....	94
5.8.1 Efecto de hidroxí análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente (Experimento 1)	95
5.8.2 Efecto de hidroxí análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente (Experimento 2)	96
5.8.3 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)	96
5.8.4 Perfil de AA de carcas de <i>L. vannamei</i> como patrón de referencia (Experimento 4)	97
5.8.5 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)	98
5.8.6 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6)	99
5.8.7 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios (Experimento 7)	99

5.8.8 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en jaulas (Experimento 8)	100
5.8.9 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)	101
5.8.10 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de <i>L. vannamei</i> (Experimento 10)	102
5.8.11 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de <i>L. vannamei</i> (Experimento 11)	103
6. RESULTADOS	105
6.1 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente (Experimento 1)	105
6.2 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente (Experimento 2)	108
6.3 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3).....	110
6.4 Perfil de AA de carcas de <i>L. vannamei</i> como patrón de referencia (Experimento 4)	111
6.5 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)	113
6.5.1 Análisis químico de las dietas	113
6.5.2 Análisis físico de las dietas	117
6.5.3 Resultados zootécnicos.....	129
6.6 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6).....	142
6.7 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios (Experimento 7)	143
6.7.1 Análisis químico de las dietas	143

6.7.2	Análisis físico de las dietas	147
6.7.3	Resultados zootécnicos.....	154
6.8	Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en jaulas (Experimento 8)	159
6.8.1	Análisis químico de las dietas	159
6.8.2	Análisis físico de las dietas	164
6.8.3	Resultados zootécnicos.....	172
6.9	Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)	176
6.9.1	Análisis físico de las dietas	176
6.9.2	Resultados de digestibilidad.....	179
6.10	Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de <i>L. vannamei</i> (Experimento 10)... ..	181
6.10.1	Análisis químico de las dietas	181
6.10.2	Análisis físico de las dietas	185
6.10.3	Resultados zootécnicos.....	189
6.11	Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de <i>L. vannamei</i> (Experimento 11)	193
6.11.1	Análisis químico de las dietas	193
6.11.2	Análisis físico de las dietas	199
6.11.3	Resultados zootécnicos.....	203
7.	DISCUSIÓN.....	212
7.1	Efecto de hidroxí análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente (Experimento 1)	212
7.1.1	Análisis químico de las dietas	212

7.1.2	Análisis físico de las dietas	212
7.1.3	Resultados Zootécnicos	214
7.2	Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente (Experimento 2)	216
7.2.1	Análisis químico de las dietas	216
7.2.2	Análisis físico de las dietas	217
7.2.3	Resultados Zootécnicos	218
7.3	Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3).....	220
7.4	Perfil de AA de carcasas de <i>L. vannamei</i> como patrón de referencia (Experimento 4)	221
7.5	Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)	227
7.5.1	Análisis químico de las dietas	227
7.5.2	Análisis físico de las dietas	228
7.5.3	Resultados Zootécnicos	230
7.6	Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6).....	233
7.7	Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios (Experimento 7)	234
7.7.1	Análisis químico de las dietas	234
7.7.2	Análisis físico de la dieta	235
7.7.3	Resultados Zootécnicos	237
7.8	Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en jaulas (Experimento 8)	239
7.8.1	Análisis físico de las dietas	240
7.8.2	Resultados Zootécnicos	241

7.9 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)	243
7.9.1 Análisis químico de las dietas	243
7.9.2 Análisis físico de las dietas	244
7.9.3 Resultados de Digestibilidad	246
7.10 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de <i>L. vannamei</i> (Experimento 10)	248
7.10.1 Análisis químico de las dietas	248
7.10.2 Análisis físico de las dietas	249
7.10.3 Resultados Zootécnicos	253
7.11 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de <i>L. vannamei</i> (Experimento 11)	254
7.11.1 Análisis químico de las dietas	254
7.11.2 Análisis físico de las dietas	255
7.11.3 Resultados Zootécnicos	257
7.11.4 Resultados de la Discriminación isotópica.....	258
7.11.5 Resultados de la Contribución de Nitrógeno y Materia Seca.....	260
7.12 Discusiones Globales	261
7.12.1 Análisis de la formulación de las dietas	261
7.12.2 Análisis físico de las dietas	285
7.12.3 Parámetros zootécnicos	288
8. CONCLUSIONES.....	291
8.1 Efecto de hidroxí análogo de Met-Ca en un dos alimentos deficientes; uno comercial y otro experimental (Experimentos 1 y 2).....	291
8.2 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3).....	292

8.3 Perfil de AA de carcas de <i>L. vannamei</i> como patrón de referencia (Experimento 4)	292
8.4 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)	293
8.5 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6).....	294
8.6 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios y en jaulas (Experimento 7 y 8)	294
8.7 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)	295
8.8 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de <i>L. vannamei</i> (Experimento 10)... ..	296
8.9 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de <i>L. vannamei</i> (Experimento 11)	297
8.10 Conclusiones Globales.....	298

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Perfil de AA de proteínas de referencia (% de Proteína).....	52
Tabla 2. Requerimientos de metionina y AAS recomendados, calculados o determinados para camarón.....	59
Tabla 3. Composición proximal, contenido de AA y coeficientes de digestibilidad de la materia seca, proteína y AA en los ingredientes usados como fuente de proteína en la dietas control deficientes en Met (% de la base húmeda).	71
Tabla 4. Composición de las dietas del experimento 1 producidas mediante peletizado por Costamar y su contenido de Met.....	74
Tabla 5. Formulación de las dietas del experimento 2 y su contenido de Met.	75
Tabla 6. Formulación de las dietas del experimento 3 y su contenido teórico de Met (base húmeda).....	77
Tabla 7. Formulación de las dietas del experimento 5 y su contenido de Met y Lys (base húmeda).....	79
Tabla 8. Formulación de las dietas del experimento 6 y su contenido teórico de Met y Lys (base húmeda).	81
Tabla 9. Formulación de las dietas del experimento 7 y 8, así como su contenido teórico de Met (base húmeda).	83
Tabla 10. Formulación de las dietas del experimento 11.....	86
Tabla 11. Parámetros de calidad de agua en los experimentos de la tesis.	94
Tabla 12. Contenido nutricional analizado de los alimentos (% base húmeda) del experimento 1.....	105
Tabla 13. Absorción de agua marina y pérdida de nutrientes por lixiviación de los alimentos después de 60 minutos de inmersión en el experimento 1 (% en base húmeda).....	106
Tabla 14. Evaluación de los parámetros zootécnicos del bioensayo del experimento 1.	107
Tabla 15. Composición del cuerpo del camarón (% en base húmeda) al inicio y final del bioensayo en el experimento 1.....	107

Tabla 16. Contenido nutricional analizado de los alimentos (% base húmeda) del experimento 2.....	108
Tabla 17. Absorción de agua marina (%) y pérdida de nutrientes por lixiviación (%) en los alimentos del experimento 2.	109
Tabla 18. Evaluación de los parámetros zootécnicos del bioensayo del experimento 2.	109
Tabla 19. Composición del cuerpo de camarón (% en peso vivo).....	110
Tabla 20. Absorción de agua marina (ABS %) y pérdida de materia seca (PMS %) por lixiviación en los alimentos del experimento 3.....	110
Tabla 21. Contenido relativo de Met en la dieta suplementada con DL-Met encapsulada en agar antes y después de lixiviar por 60 minutos así como en el agua de lixiviación (% base seca del alimento antes de lixiviar), además de la PMet calculada a partir de ellas.....	111
Tabla 22. Perfil de AA, AA totales y el contenido de proteína del cuerpo entero de camarón, de los 4 grupos de camarones colectados en el experimento 4 (% 91.5 de materia seca).....	112
Tabla 23. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 15 minutos de inmersión en agua del experimento 5.....	115
Tabla 24. Correlación entre el contenido de Agar y la ABS (% en base húmeda) de agua marina en la dietas del experimento 5.....	118
Tabla 25. PMS y PPC a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión con el MT y 60 minutos con el MN en los alimentos del experimento 5.....	123
Tabla 26. Porcentaje de PMet total, PMet encapsulada, PLys total, PLys encapsulada, PArg y PCys a los 15, 30 y 60 min con el MT y a los 60 min con el MN.....	128
Tabla 27. Resultados zootécnicos a los 42 días de experimentación entre las dietas experimentales y la dieta comercial del bioensayo del experimento 5.....	133
Tabla 28. Resultados zootécnicos a los 42 días de experimentación producidos por las dietas con diferentes niveles de Lys en el bioensayo del experimento 5.....	135
Tabla 29. Composición proximal (base húmeda) de los alimentos deficiente en Met con variación en el contenido de lupino, chícharo amarillo y verde (experimento 6).	142

Tabla 30. Comparaciones de la ABS y PMS entre las dietas deficientes de chícharo amarillo 1 y 2 y entre la dieta deficiente de chícharo amarillo 2 y la de chícharo verde 1.....	143
Tabla 31. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 15 minutos de inmersión en agua del experimento 7.....	145
Tabla 32. ABS, PMS y PPC a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en los alimentos del experimento 7.....	152
Tabla 33. Porcentaje de PMet total, PMet libre, PLys total, PArg y PCys a los 60 minutos de inmersión en el agua, en los alimentos del experimento 7.....	153
Tabla 34. Resultados zootécnicos a los 14 días de experimentación entre las dietas experimentales y la dieta comercial del bioensayo del experimento 7.....	157
Tabla 35. Resultados de los parámetros zootécnicos a los 14 días entre las dietas con diferentes niveles de Met en el bioensayo del experimento 7.	158
Tabla 36. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 15 minutos de inmersión en agua del experimento 8.....	163
Tabla 37. ABS, PMS y PPC a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en los alimentos del experimento 8.....	169
Tabla 38. Porcentaje de pérdida de Met, Met libre, Lys, Arg y Cys a los 60 minutos de inmersión en agua en los alimentos del experimento 8.	171
Tabla 39. Resultados zootécnicos a los 28 días de experimentación, utilizando al individuo como la unidad experimental, para el conjunto de las dietas experimentales y la dieta comercial del experimento 8.	174
Tabla 40. Resultados zootécnicos a los 28 días de experimentación, utilizando al tanque como la unidad experimental, para el conjunto de las dietas experimentales y la dieta comercial del experimento 8.	175
Tabla 41. Contenido nutricional analizado de los alimentos (base húmeda) del experimento 9.....	176
Tabla 42. Evaluación de la ABS y PMS por lixiviación en los alimentos del experimento 9.....	178

Tabla 43. Evaluación de la digestibilidad de la dieta a base de chícharo 1 con y sin pos-acondicionamiento, utilizando animales con distinto origen en el experimento 9.	180
Tabla 44. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 60 minutos de inmersión en agua del experimento 10.....	183
Tabla 45. Evaluación de la ABS, PMS, PPC y PE por lixiviación en los alimentos del experimento 10.....	188
Tabla 46. Porcentaje de PMet total, PMet encapsulada, PLys total, PArg y PCys a los 60 minutos de inmersión en agua.....	189
Tabla 47. Evaluación de los parámetros zootécnicos acumulados a los 35 días, utilizando al tanque como la unidad experimental, para las dietas experimentales del experimento 10.....	190
Tabla 48. Evaluación de los parámetros zootécnicos acumulados a los 35 días, utilizando al camarón como la unidad experimental, para las dietas experimentales del experimento 10.....	191
Tabla 49. Evaluación de los parámetros zootécnicos calculados de los 36-42 días del bioensayo, utilizando al tanque como la unidad experimental, para las dietas experimentales del experimento 10.	192
Tabla 50. Contenido proximal analizado de los alimentos (base húmeda) y de AA (base seca) del experimento 11.	196
Tabla 51. ABS, PMS, PPC y PE a los 60 minutos en los alimentos del experimento 11.	202
Tabla 52. Evaluación de los parámetros zootécnicos a los 29 días en el bioensayo de contribuciones del experimento 11.	205
Tabla 53. Tasas de crecimiento (k), tasas estimadas de recambio metabólico (m) y tiempos medios de residencia (t_{50}) en músculo de camarón <i>L. vannamei</i> cultivados con las dietas del experimento 11. La discriminación isotópica corresponde a las diferencias entre las dietas y el tejido muscular después de alcanzar el equilibrio ($\Delta^{15}\text{N}$).	207

Tabla 54. Perfil de AA propuesto como patrón de referencia para el cuerpo entero de <i>L. vannamei</i> (% PC), recomendaciones para la industria, límites superior e inferior de AA (intervalo de confianza = 95%) en harinas de camarón, además de valores de AA reportados para el cuerpo entero, músculo de la cola y cabeza de camarón. Los valores fueron correlacionados respecto al perfil de AA propuesto como patrón..	225
Tabla 55. Comparación global de las fórmulas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.	267
Tabla 56. Composición proximal (% bh) de las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.	269
Tabla 57. Contenido teórico de AA crudos, colina y AA digestibles en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.	270
Tabla 58. Contenido analizado de AA crudos en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.	274
Tabla 59. Contenido digestible de AA en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.	276
Tabla 60. Contenido digestible de AA en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.	278
Tabla 61. Resumen de la estabilidad y pérdida de nutrientes en las dietas utilizadas en la tesis a los 60 minutos de inmersión en agua marina.	287
Tabla 62. Resumen de los parámetros zootécnicos obtenidos en función de las dietas de base utilizadas en la tesis.	290

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. A) F'órmulas semidesarrolladas del hidroxianálogo ácido 2-hidroxi-4-metiltio-butanoico (HMTBA) y de la DL-Met. B) Esquema de la molécula del hidroxianálogo unido a calcio, MHA (Novus, 2005).....	58
Figura 2. Resumen de las dietas de base deficientes en Met y de productos evaluados en los diferentes experimentos realizados en el desarrollo de la tesis.	63
Figura 3. Hoja de especificaciones de la MHA-Ca utilizada en la tesis	65
Figura 4. Certificado de análisis de la DL-Met empleada en la presente tesis.	66
Figura 5. Hoja de especificaciones de la L-Lys-HCl empleada en la presente tesis.	67
Figura 6. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 5..	113
Figura 7. Contenido de AA en las dietas antes y después de 15 minutos de inmersión (% en base seca).	116
Figura 8. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 15 minutos de inmersión en agua (% en base seca).	117
Figura 9. Correlación entre el contenido de dietario de agar y la absorción de agua del pelet (% bh dieta)..	118
Figura 10. Cinética de pérdida de materia seca, método tradicional.	119
Figura 11. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos, así como a 60 minutos con el nuevo método.....	119
Figura 12. Comparación de la pérdida de materia seca a 60 minutos, por método tradicional o nuevo..	120
Figura 13. Cinéticas de la pérdida de proteína (% bs), método tradicional.	121
Figura 14. Comparación de pérdida de proteína (% bs) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos, así como a 60 min con el nuevo método..	121
Figura 15. Comparación de la pérdida de proteína (%bs) a 60 minutos, por método tradicional o nuevo..	122

Figura 16 Cinética de la pérdida de Met (%).	124
Figura 17. Cinética de la pérdida de DL-Met encapsulada (%).	125
Figura 18. Cinética de la pérdida de Lys (%).	125
Figura 19. Cinética de la pérdida de HCl-Lys encapsulada (%).	126
Figura 20. Cinética de la pérdida de Arg (%).	126
Figura 21. Cinética de la pérdida de Cys (%).	127
Figura 22. Supervivencia (12 animales iniciales) entre todos los tratamientos, de 0-42 días. Deficiente en Met-Lys (0.42% de Met y 1.65% de Lys) y Deficiente en Lys (0.82% de Met y 1.65% de Lys).	130
Figura 23. Comparación de UNMet promedio (n=4) de los camarones experimentales a 42 días de experimentación.	131
Figura 24. TCA promedio (alimento consumido bs/incremento en peso) (n=4), de las 6 dietas, de 0-42 días.	132
Figura 25. UNP promedio calculada en base a los análisis proximales realizados por maricultura para todos los tratamientos, a los 42 días de experimentación.	132
Figura 26. Supervivencia (%) de camarones que consumieron (12 animales iniciales) las dietas con dosis crecientes de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35), de 0-42 días de experimentación.	136
Figura 27. Correlación de la Suv promedio de los camarones alimentados con los tratamientos con el contenido creciente de Lys analizada (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días.	136
Figura 28. Incremento en el peso promedio del camarón (g, n=4) alimentados con dosis crecientes de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días.	137
Figura 29. GP promedio (% en vivo, n=4) de las dietas con dosis crecientes de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días.	137
Figura 30. Correlación de la GP promedio de los camarones alimentados con los tratamientos con el contenido creciente de Lys analizada (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días.	138
Figura 31. TCE promedio (n=4) de los camarones que consumieron las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 14-42 días.	138

Figura 32. TCA promedio (alimento consumido bs/incremento en peso, n=4) producido con las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días..	139
Figura 33. UNP promedio (calculada en base a los análisis proximales de maricultura, n=4) de las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días..	139
Figura 34. UNMet promedio (n=4) de las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días..	140
Figura 35. Correlación de la UNMet promedio de los camarones alimentados con los tratamientos con el contenido creciente de Lys analizada (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días.	140
Figura 36. Correlación de la Suv con la GP con el contenido de Lys (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días..	141
Figura 37. Correlaciones de la Suv Vs. TCA, UNP y UNMet utilizando los tratamientos con el contenido creciente de Lys (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días.....	141
Figura 38. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 7. P es la probabilidad de Anova..	144
Figura 39. Contenido de AA en las dietas (A) antes y (B) después de 15 minutos de inmersión (% en base seca).	146
Figura 40. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 15 minutos de inmersión en agua (% en base seca).	147
Figura 41. Cinética de ABS de agua de los alimentos del experimento 7.	148
Figura 42. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 7 a los 15, 30 y 60 minutos.....	149
Figura 43. Cinética de pérdida de materia seca en los alimentos del experimento 7.	149
Figura 44. Comparación de pérdida de proteína (% bs) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en el agua..	150
Figura 45. Cinéticas de la pérdida de proteína (% bs).	151
Figura 46. Porcentaje de PMet total, PCys, PMet+Cys, PLys, PArg y PMet libre a los 60 minutos de inmersión en el agua, en los alimentos del experimento 7.	154

Figura 47. Supervivencia (10 animales iniciales) de todos los tratamientos, de 0-14 días. Deficiente en Met-Lys (0.42% de Met y 2.05% de Lys)..	154
Figura 48. Consumo promedio por individuo (% en base seca)..	155
Figura 49. TEP promedio calculada en base a los análisis proximales realizados por maricultura para todos los tratamientos, a los 14 días de experimentación..	156
Figura 50. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 8..	159
Figura 51. Contenido de AA en las dietas (A) antes y (B) después de 15 minutos de inmersión (% en base seca).	161
Figura 52. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 15 minutos de inmersión en agua (% en base seca).	162
Figura 53. Cinética de ABS de agua de los alimentos del experimento 8.	164
Figura 54. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 8 a los 15, 30 y 60 minutos.	165
Figura 55. Cinética de pérdida de materia seca en los alimentos del experimento 8.	166
Figura 56. Comparación de pérdida de proteína (% bs) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en el agua.	167
Figura 57. Cinéticas de la pérdida de proteína (% bs) del experimento 8.	167
Figura 58. Porcentaje de PMet total, PCys, PMet+Cys, PLys, PArg y PMet libre a los 60 minutos de inmersión en el agua, en los alimentos del experimento 8.	171
Figura 59. Supervivencia (5 animales iniciales) entre todos los tratamientos (n=4), de 0-28 días. Deficiente en Met-Lys (0.42% de Met y 2.05% de Lys)..	172
Figura 60. EA promedio (incremento en peso/alimento consumido bs, n=15) producida con dosis crecientes de DL-Met (0, 0.20, 0.40 y 0.8% de la dieta), de 0-28 días.	173
Figura 61. TEP promedio calculada en base a los análisis proximales realizados por maricultura para todos los tratamientos, a los 28 días de experimentación..	173
Figura 62. Incremento en el peso promedio del camarón (g, n=4) alimentados con dosis crecientes de DL-Met (0, 0.20, 0.40 y 0.8% de la dieta), de 0-28 días.	175
Figura 63. Comparación de la cinética de ABS de agua (%) de los alimentos sin y con pos-acondicionamiento a los 15, 30 y 60 minutos.	177

Figura 64. Comparación de la cinética de pérdida de materia seca (%) de los alimentos sin y con pos-acondicionamiento a los 15, 30 y 60 minutos.....	178
Figura 65. Efecto del proceso de pos-acondicionamiento sobre la digestibilidad de materia seca, proteína y energía.....	179
Figura 66. Efecto del origen de los animales sobre la digestibilidad de materia seca, PC y energía.....	180
Figura 67. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 10.....	181
Figura 68. Contenido de AA en las dietas (A) antes y (B) después de 60 minutos de inmersión (% en base seca).....	184
Figura 69. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 60 minutos de inmersión en agua (% en base seca).....	185
Figura 70. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos a los 60 minutos.....	186
Figura 71. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 10 a los 15, 30 y 60 minutos.....	187
Figura 72. Porcentaje de PMet total, PCys, PMet+PCys, PLys, PArg y PMet encapsulada a los 60 minutos de inmersión en agua.....	189
Figura 73. Supervivencia (5 animales iniciales) de los camarones alimentados con los distintos tratamientos, de 0-42 días.....	192
Figura 74. GP acumulada promedio (% , n _{tanque} =3) alimentados con la dieta deficiente chícharo verde 1 procesada de distinta manera, de 0-42 días.....	193
Figura 75. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 11.....	194
Figura 76. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 11 y su correlación con el porcentaje de inclusión de la fórmula deficiente chícharo verde 3.....	195
Figura 77. Contenido estimado de los AA dietarios obtenido a partir del contenido analizado en las dietas de base con 100% de proteína de chícharo y 100% de proteína de pescado del experimento 11.....	198

Figura 78. Comparación de absorción de agua (%) entre los alimentos del experimento 11 a los 60 minutos. PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado..	199
Figura 79. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 11 a los 60 minutos. PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado..	201
Figura 80. Sobrevivencia promedio (7 animales finales) de todos los tratamientos (n=3) a los 29 días. PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado..	203
Figura 81. GP promedio (% en vivo, n=3). PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado..	204
Figura 82. Comparación del crecimiento (k), recambio metabólico (m) y tiempo de residencia media del nitrógeno (t_{50}), obtenidos a partir del modelo Hesslein..	208
Figura 83. Cinéticas de los cambios en los valores del isótopo estable de nitrógeno (‰) en el músculo de <i>L. vannamei</i> al ser alimentados con las dietas del experimento 11, partiendo de una dieta de acondicionamiento. Los valores predichos mediante el modelos de Hesslein <i>et al.</i> (1993) se presentan en líneas punteadas. Las flechas representan los factores de discriminación isotópica entre el músculo de camarón y las respectivas dietas con 100% de proteína de pescado o de chícharo.	209
Figura 84. Las proporciones esperadas y observadas de nitrógeno en la que contribuyeron la harinas de chícharo y de pescado al nitrógeno en el músculo de <i>L. vannamei</i> . Las contribuciones se estimaron usando un modelo de un isotopo y dos fuentes (n=18)..	210
Figura 85. Las proporciones esperadas y observadas de materia seca en la que contribuyeron la harinas de chícharo y de pescado a la materia seca en el músculo de <i>L. vannamei</i> . Las contribuciones se estimaron a partir de las contribuciones de nitrógeno corregidas por las concentraciones de nitrógeno en los ingredientes (Fry, 2006) (n=18)..	211

Figura 86. Comparación de los perfiles de AA del carcas de <i>L. vannamei</i> , del sugerido por Akiyama (1991) y de los ingredientes utilizados en la formulación de dietas para el presente trabajo.	265
Figura 87. Comparación de los perfiles de AA del carcas de <i>L. vannamei</i> , del sugerido por Akiyama (1991) y de los AA digestibles de los ingredientes utilizados en el presente trabajo.....	266
Figura 88. Contenido analizado de AA crudos en las dietas de base deficientes en Met, relativo al de carcas de juveniles de <i>L. vannamei</i>	275
Figura 89. Contenido digestible de AA en las dietas de base deficientes en Met, relativo al de carcas de juveniles de <i>L. vannamei</i>	277
Figura 90. Contenido digestible de AA corregido por lixiviación en las dietas de base deficientes en Met, relativo al de carcas de juveniles de <i>L. vannamei</i>	279

NOMENCLATURA

AA	Aminoácido/s
AAC	Aminoácido/s cristalino/s
AAD	Aminoácido/s dispensables/s
AAI	Aminoácido/s indispensable/s
AAL	Aminoácido/s libre/s
AAS	Aminoácido/s azufrados/s
ABS	Absorción de agua
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico (aspartato)
bh	Base húmeda
bs	Base seca
C	Celsius
Cal	Caloría
CEC	Camarón entero
CMC	Carboxi metil celulosa
Cons	Consumo individual
Cys	Cistina
EA	Eficiencia alimenticia
g	Gramo
Glu	Ácido glutámico (glutamato)
Gly	Glicina
GP	Ganancia en peso
His	Histidina
HMTBa	Ácido 2-hidroxi-4-metiltio butanoico
Ile	Isoleucina
<i>k</i>	Contribución del N al crecimiento
k	kilo
Leu	Leucina
lix	lixiviado
Lys	Lisina
<i>m</i>	Contribución del N al recambio metabólico
m	Metro
Met	Metionina
MHA	Hidroxi análogo de metionina-calcio
MN	Método nuevo
MT	Método tradicional

PAA	Pérdida de aminoácidos
PArg	Pérdida de Arginina
PC	Proteína cruda
PCH	Proteína de chícharo
PCys	Pérdida de Cys
PE	Pérdida de energía
Phe	Fenilalanina
PLys	Pérdida de Lys
PMet	Pérdida de Met
PMS	Pérdida de materia seca
PP	Proteína de pescado
PPC	Pérdida de proteína cruda
Pro	Prolina
Ser	Serina
Suv	Supervivencia
Tau	Taurina
TCA	Tasa de conversión alimenticia
TCE	Tasa de crecimiento específico
TEP	Tasa de eficiencia proteica
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
UNLys	Utilización neta de Lys
UNMet	Utilización neta de Met
UNP	Utilización neta de proteína
Val	Valina
Vs	Versus

RESUMEN

A pesar de que el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es la especie más cultivada en el mundo, los requerimientos de AAI, excepto Lys aún no se conocen, con precisión. En consecuencia, la industria fórmula en base a los niveles de AA recomendados por Akiyama *et al.* (1991). Sin embargo, el desarrollo reciente de fórmulas comerciales a base de proteína vegetal, principalmente soya, que generan rendimientos equivalentes a los obtenidos con alimentos conteniendo harina de pescado y con niveles menores de metionina a los recomendados por Akiyama, indica que estos últimos están sobreestimados. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar fórmulas deficientes exclusivamente en Met, estables en el agua, a base de proteína vegetal íntegra principalmente, con valores conocidos de AA digestibles e hidrostables para determinar el efecto de diversas fuentes y niveles de Met sobre el rendimiento de juveniles de *L. vannamei*. Se formularon 14 diferentes dietas con deficiencias en Met de 19 a 70% con respecto a las recomendaciones de Akiyama. La dieta soya 1 con un contenido teórico 0.58% de Met digestible (30% de PC) y una deficiencia del 19% no afectó el rendimiento del camarón y confirma que la recomendación de Akiyama (0.72%) está sobreestimada. Las dietas deficientes soya 4, chícharo verde 1 y 2 con contenidos de 0.37-0.43% de Met y deficiencias de 47 a 50% produjeron mortalidad progresiva y significativa a los 42 de experimentación. La mortalidad fue la manifestación más clara de una deficiencia en Met sobre los parámetros zootécnicos. La inclusión de los diferentes productos de Met evaluados (MHA, Met libre, Met encapsulada en agar y en CMC) en las dietas deficientes propuestas, no mejoró el rendimiento en *L. vannamei*, excepto en el caso de la dieta soya 4 a base de soya/trigo, sin harina de pescado y con bajo contenido de lecitina, donde la inclusión de Met encapsulada en agar mejoró significativamente la sobrevivencia. Todos los productos de Met evaluados así como algunos AAI de las dietas (Met, Lys, Arg) presentaron alta tasa de lixiviación desde los 15min de inmersión. Se determinó y comparó el perfil de AA del carcas de camarón, cultivado en diferentes condiciones, con la referencia de Akiyama y se encontró un 13% menos Met, pero 25 y 20% más de Lys y

Arg. El uso de una referencia u otra tiene implicaciones económicas muy importantes. En las dietas formuladas en este estudio, varios AAI se volvieron deficientes cuando se calculó su contenido digestible e hidroestable, aunque la Met resultó ser el primer limitante. La fórmula con proteínas intactas, digestibles, más estable en el agua, y únicamente deficiente en Met fue la 60:40 de proteínas de chícharo y de pescado, con deficiencias de AAS (11% respecto al carcas de camarón) suficientemente altas para evaluar productos de Met estables en agua y definir el requerimiento de Met con experimentos dosis respuesta. En la definición de fórmulas control para determinar el requerimiento de Met es muy importante tener en cuenta además de las variables evaluadas en este trabajo, el aporte de Cys, colina, taurina, betaina y otros compuestos que puedan modificar el requerimiento de Met, por su efecto ahorrador al participar en funciones metabólicas diferentes a la acreción proteica.

ABSTRACT

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* is the most cultivated species in the world, although indispensable amino acids (AA) requirements are not yet known with precision except Lysine. Consequently the industry had formulated based on amino acid (AA) levels recommended by Akiyama *et al.* (1991). However, the recent development of commercial formulas based on vegetable protein, mainly soybeans and methionine (Met) levels below those recommended by Akiyama, which generate returns equivalent to the obtained with feeds containing fish meal; indicate that the Akiyama's recommendation is overestimated. The objective of this work was to develop deficient formulas exclusively in Met, stable in water, mainly based on complete vegetable protein with known values of digestible AA to determine the effect of different sources and levels of Met on performance of young *L. vannamei*. Fourteen different diets were formulated with deficiencies in Met from 19 to 70% in respect to Akiyama's recommendation. The soy-1 deficient diet was 19% deficient (containing 0.58% of Met and 30% CP) and did not show negatives effects on the performance of shrimp, then confirms that Akiyama's recommendation is overestimated. The deficient diets soy-4, green pea 1 and 2 with a Met content from 0.37 to 0.43% and deficiencies from 47 to 50% caused progressive and significant mortality at 42 days of experimentation. Mortality was the most clear effect caused by the Met deficiency, over all the zootechnical parameters evaluated. The inclusion of different products evaluated Met (MHA, free Met, Met encapsulated in agar and CMC) in the proposed deficient diets did not improve performance in *L. vannamei*, except in the case of the diet soybean-4 formulated with soy/wheat, without fish meal and low-lecithin content, where the inclusion of Met encapsulated in agar significantly improved survival. Every Met product tested as well as several structural AAI of protein in the diets (Met, Lys, Arg) showed a high leaching rate since 15 minutes of immersion. The AA profile of shrimp carcass grown under different conditions was determined and then was compared against Akiyama's recommendations. The Met value in shrimp carcass was 13% lower than Akiyama's recommendation, but Lys and Arg were higher in 25 and 20%, respectively.

The use of shrimp carcass profile or Akiyama's recommendation as reference has important economic implications. The digestible and water stable AA content of the diets formulated in this study showed deficiencies in other indispensable AA than Met, although Met was the first limiting AA. The formula with intact protein, digestible, and more stable in water, was the 60:40 ratio of pea protein and fish protein, with high enough deficiencies of sulfur AA (11% on the Carcass of shrimp) to evaluate Met products stable in water and the Met requirement with dose-response experiments. The contribution of Cys, choline, taurine, betaine and other as important compounds that could modify the Met requirement must be considered in these studies.

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es actualmente la especie más cultivada en el mundo con una producción mundial durante 2008 de 2,25 millones de toneladas, con un valor de 9 billones de \$US (FAO, 2010). Bajo condiciones de cultivo semi-intensivo, el alimento representa alrededor de un 49% de los costos de producción. En el año 2010 México consumió aproximadamente 200,000 toneladas de alimento para engorda con un precio de 200 millones de dólares (Cruz Suárez, 2011). A pesar de ello, la información existente sobre los requerimientos nutricionales del camarón blanco aún es muy limitada o poco precisa por las problemáticas que su definición con lleva, reflejándose en la producción comercial de dietas poco eficientes que afectan negativamente la productividad y competitividad de la industria.

Por otro lado, debido a que la harina de pescado cada vez es más costosa y menos disponible, en los últimos años muchos estudios se han enfocado en sustituir la harina de pescado con proteínas vegetales. Sin embargo, debido a que el valor nutritivo de la proteína dietaria está determinado entre otros por su perfil de AA y por el contenido de AA digestibles este conocimiento debe ser detallado con antelación para definir los requerimientos de AA digestibles especialmente de los que son los primeros limitantes en las proteínas vegetales como es el caso de la Met.

Por el momento, para *L. vannamei* solo se cuenta con las recomendaciones reportadas por Akiyama *et al.* (1991) para penaeidos y únicamente se ha determinado el requerimiento de Lys por Fox *et al.* (1995) y de Thr por Huai *et al.* (2009b) sin definir la digestibilidad de las dietas usadas. El caso de *Penaeus monodon* y *Marsupenaeus japonicus* es diferente, pues se han definido los requerimientos de los 10 AAI (Millamena *et al.*, 1996b; Millamena *et al.*, 1996a; Millamena *et al.*, 1997; Millamena *et al.*, 1998; Millamena *et al.*, 1999; Teshima *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2009) sin embargo, el requerimiento de los AA digestibles aún no ha sido definido.

De acuerdo a estudios recientes (Cruz Suárez *et al.*, 2005; Cruz-Suarez *et al.*, 2006; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006; Amaya *et al.*, 2007a; Amaya *et al.*, 2007b) los niveles de Met recomendados para alimento de camarón blanco parecen estar sobrestimados, porque con niveles de hasta 0.4-0.6% de la dieta usando ingredientes vegetales como pasta y concentrados o aislados de soya se han encontrado crecimientos similares que con 0.8% de Met en la dieta. La gran solubilidad y lixiviación de las Met sintéticas, empleadas en determinar el requerimiento de éste AA, parecían ser la causa principal de esta supuesta sobrestimación.

En el presente estudio inicialmente se pretendía determinar el requerimiento de Met para *L. vannamei* utilizando el método de dosis-respuesta y dietas de base deficientes en éste AA; empleando ingredientes prácticos deficientes en Met, pero altamente digestibles como pasta y aislado de soya, trigo y chícharo (Cruz Suárez *et al.*, 2005; Cruz-Suárez *et al.*, 2009; Nieto-López *et al.*, 2011; Villareal Cavazos, 2011) y varias fuentes de Met comercial como el hidroxí análogo de Met (MHA-Ca) reportada como de baja lixiviación (Vazquez-Añon and Giesen, 2004), DL-Met libre y encapsulada con CMC o con agar. Sin embargo, el objetivo principal fue derivando en el desarrollo de una fórmula control deficiente exclusivamente en Met, con proteínas intactas y con bajo grado de lixiviación. Así mismo, el desarrollo y evaluación de metodologías y herramientas para medir lixiviación, para aumentar la estabilidad de las dietas, para trabajar con animales en forma individual y para medir la contribución de N y materia seca de ingredientes deficientes en Met como harina de chícharo.

2. HIPOTÉISIS

2.1 Hipotéisis General

El requerimiento de Met en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), definido con el método dosis respuesta, diferentes fuentes de Met y dietas prácticas a base de proteínas vegetales altamente digestibles es menor al valor recomendado por Akiyama *et al.* (1991).

2.2 Hipotéisis Particulares

1. El hidroxí análogo de metionina-calcio, es una fuente de Met capaz de suplementar un alimento comercial deficiente en Met y rico en pasta de soya respecto a las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) utilizadas por la industria para juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
2. El hidroxí análogo de metionina-calcio, como fuente de Met capaz de suplementar un alimento experimental deficiente en éste aminoácido respecto a las recomendaciones Akiyama *et al.* (1991) para juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
3. La estabilidad en el agua de la DL-metionina incorporada en un alimento experimental se mejora al ser encapsulada en agar-agar.
4. El perfil de AA del carcas de juveniles de *Litopenaeus vannamei* de distintas tallas es constante y se puede usar de forma preliminar como un patrón de

referencia para el estudio de los requerimientos de AA dietarios en este camarón.

5. En dietas a base de soya/trigo el primer AA limitante es la Lys y no la Met, cuando se usa como referencia el contenido de Lys y Met del carcas de camarón.
6. Los cambios en la fórmula deficiente en Met del bioensayo Degussa 2006 (eliminación de lupino y harina de kelp, adición de aislado de soya y sustitución de chícharo amarillo por verde) permiten mejorar la absorción y estabilidad en el agua de los alimentos.
7. La adición de DL-metionina libre en una dieta experimental a base de chícharo verde de Canadá deficiente en Met respecto al perfil de aminoácidos del carcas de juveniles de *Litopenaeus vannamei*, a pesar de que se lixivia casi totalmente a los 15 minutos de inmersión en agua, mejora la sobrevivencia y el rendimiento del camarón.
8. La adición de DL-metionina libre a la dieta experimental a base de chícharo verde de Canadá deficiente en Met respecto al perfil de AA del carcas de juveniles camarón blanco de *Litopenaeus vannamei* mejora el rendimiento cuando se evita el canibalismo usando jaulas individuales.
9. El pos-acondicionamiento de la dieta experimental a base de chícharo verde de Canadá mejora su estabilidad y su digestibilidad.
10. Los procesos de pos-condicionamiento, de inclusión de DL-metionina encapsulada en carboxi-metil-celulosa y de inclusión de un atrayente comercial espreado en la dieta experimental a base de chícharo verde de Canadá mejoran la estabilidad de la dieta, su consumo y el rendimiento del camarón.

11. El grado de contribución relativa de nitrógeno dietario de las harinas de chícharo verde (*Pisum sativum*) de Canadá al tejido muscular de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es menor que el de harina de pescado (sardina).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer el requerimiento de Met en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), para la formulación de dietas prácticas altamente digestibles.

3.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar el hidroximetionina calcio como fuente de Met, en un alimento comercial deficiente en éste aminoácido respecto a las recomendaciones utilizadas por la industria para juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
2. Evaluar el hidroximetionina calcio como fuente de Met, en un alimento experimental deficiente en éste aminoácido respecto a las recomendaciones utilizadas por la industria para juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
3. Evaluar la estabilidad en el agua de DL-metionina encapsulada en agar-agar al incluirla en un alimento experimental con y sin pre-acondicionamiento para juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
4. Definir el perfil de aminoácidos del carcas de camarón para usarlo como un patrón de referencia para el estudio de los requerimientos de AA dietarios en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

5. Evaluar la estabilidad de Met y Lys encapsuladas en agar al incluirlas en un alimento a base de soya/trigo y su efecto sobre el rendimiento en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
6. Evaluar el efecto del cambio en la fórmula deficiente en Met del bioensayo Degussa 2006 (eliminación de lupino y harina de kelp, adición de aislado de soya y sustitución de chícharo amarillo por verde) sobre la absorción y estabilidad en el agua de los alimentos utilizando un método modificado.
7. Evaluar los efectos de la adición de diferentes niveles de DL-metionina libre a la dieta deficiente en Met a base de chícharo verde 2 sobre la estabilidad del alimento, la sobrevivencia y el rendimiento de juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
8. Evaluar los efectos de la adición de diferentes niveles de DL-metionina libre a la dieta deficiente en Met a base de chícharo verde 2 sobre la estabilidad del alimento, la sobrevivencia y el rendimiento de juveniles de *Litopenaeus vannamei* cultivados en jaulas individuales.
9. Evaluar el efecto del pos-acondicionamiento de la dieta deficiente en Met a base de chícharo verde 1 sobre la estabilidad y la digestibilidad de la misma, en juveniles de *Litopenaeus vannamei* de distinto origen.
10. Evaluar el efecto de los procesos de pos-condicionamiento, de adicionar DL-metionina encapsulada en carboxi-metil-celulosa y de adicionar un atrayente comercial esparcido a la dieta deficiente en Met a base de chícharo verde 1 sobre la estabilidad de la dieta, sobrevivencia y el rendimiento de juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

11. Evaluar el grado de contribución relativa de nitrógeno dietario de las harinas de chícharo verde (*Pisum sativum*) de Canadá y de pescado (sardina) al crecimiento corporal de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, por su gran capacidad de adaptación y de aceptación en el mercado tiene una dispersión cosmopolita en acuicultura. Su introducción en Asia permitió que a partir de 2004 fuese la especie de camarón más cultivada a nivel mundial con 1.3 millones de toneladas; los datos más actuales de la FAO arrojan cifras cercanas a 2.3 millones de toneladas, el 45% de la producción de crustáceos por acuicultura a nivel global (Wilson, 2003; FAO, 2010). De esta especie, nativa en México, el 66% es producido por acuicultura con 130 mil toneladas, que en términos económicos significa un aporte de 236 millones de dólares en divisas y 5463 millones de pesos a nivel de productores primarios, además se espera el crecimiento de esta actividad económica (SAGARPA, 2009).

El incremento en la producción de camarón progresivamente ha demandado mayores cantidades de alimento formulado, mismo que representa el mayor de los costos de producción de camarón de entre 50 y 70% para sistemas semi-intensivos o intensivos (Cruz-Suárez *et al.*, 2002; McIntosh, 2010). A su vez la proteína se convierte en el nutriente más oneroso, debido a la escasez de ingredientes con una calidad adecuada, al costo de éstos y a las implicaciones ambientales por la liberación de compuestos nitrogenados en el agua (Gomez-Jimenez *et al.*, 2004).

Tradicionalmente la harina de pescado es uno de los principales ingredientes usados en la formulación de alimentos para organismos acuáticos y se estima que en 2006 el 68% de la producción de harina de pescado fue utilizada por la industria de la acuicultura (Tacon and Metian, 2008). El alza en la demanda de proteínas marinas propició, la poca disponibilidad de harina de pescado y el incremento en su precio, lo que condujo a la búsqueda de fuentes alternas de proteína tales como: subproductos de animales terrestres, subproductos de industrias alimenticias (*e.g.* destilería) y productos

de origen vegetal. Las proteínas de origen vegetal han sido las opciones más adecuadas con base en un suministro sustentable e ilimitado, una calidad uniforme y un costo relativamente accesible (Davis and Arnold, 2000; Davies and Gouveia, 2010). Los productos de semillas de leguminosas son especialmente aceptados por su alto contenido de proteína en relación a los de otros vegetales, aunque presentan bajos niveles de Met, Lys y Arg con respecto al contenido relativo de los mismos AA en la proteína del pescado. En este respecto la Met resulta ser el aminoácido más limitante.

La información existente sobre los requerimientos nutricionales de *L. vannamei* es escasa e incipiente como para explotar correctamente el potencial de las fuentes de proteína de origen vegetal, reflejándose en dietas que resultan en poca productividad y competitividad en la industria. De acuerdo con Cruz-Suárez *et al.* (2005) las compañías productoras de alimento para este camarón en México y América Latina, formulan en base a requerimientos de “proteína” usando las recomendaciones de AA generalizadas para camarones penaeidos y publicadas por Akiyama *et al.* (1991). Es muy probable que los niveles de AA actualmente utilizados en la formulación de alimentos para *L. vannamei* estén sobreestimados, especialmente al utilizar niveles excesivos de proteína (35-40%) con respecto a aquel (25-30%) reportado como requerido por Cruz-Suárez *et al.* (2000) y Velasco *et al.* (2000).

Es común que en la literatura se haga referencia al requerimiento de proteína cruda (PC), sin embargo esta incluye a todo compuesto nitrogenado (quitina, ácidos nucleicos, amidas, aminos e inclusive compuestos inorgánicos), cuando en realidad el requerimiento debe establecerse en función de las unidades estructurales de las proteínas, los AA. El requerimiento real de un nutriente define la cantidad mínima del nutriente por biomasa (expresada como organismo o Kg) por día para obtener el máximo crecimiento, aunque es frecuente que el término requerimiento de AA sea referido en la bibliografía como el nivel óptimo (porcentaje mínimo) del AA en relación al contenido de proteína cruda en la dieta; un término ambiguo dado que el nivel dietario del nutriente puede ser compensado con la tasa de alimentación y se asume que los AA en exceso están adecuadamente balanceados (Bureau and Encarnacao, 2006). A partir del uso de proteínas vegetales (e.g. soya) y un presunto exceso de AA en la elaboración de

alimentos para *L. vannamei* resulta urgente evaluar el requerimiento de Met para obtener alimentos óptimos y una menor relación costo beneficio.

4.2 Balance de Aminoácidos

La unidad fundamental de las proteínas son los AA (20 presentes de manera común), los cuales definen sus características estructurales y funcionales. En el metabolismo celular desempeñan un papel principal, ya que todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas constituidas por residuos de AA (Lehninger *et al.*, 1995). Los AA son vitales para el metabolismo de lípidos y de carbohidratos, para la síntesis de proteína tisular y de otros compuestos además de servir como fuente metabólica de energía (Lehninger *et al.*, 1995).

4.2.1 Requerimientos Cualitativos de Aminoácidos en Crustáceos

Para propósitos nutricionales, los AA se suelen dividir en dos grupos: los AA indispensables (AAI) y los AA dispensables (AAD). Los AAI son aquellos para los cuales el organismo carece de una ruta de síntesis metabólica y que no pueden ser sintetizados dentro del cuerpo animal, o bien no lo son a una velocidad adecuada que permita cubrir las necesidades fisiológicas del animal en crecimiento y por lo tanto deben ser suministrados en la dieta. Los AAD son aquellos que pueden ser sintetizados en el cuerpo, a partir de una fuente de carbono adecuada y de grupos aminos provenientes de otros AA ya elaborados o de compuestos simples, como el citrato de amonio y no necesitan ser suministrados en la dieta.

Guillaume (1997) hizo una revisión de los AAI hallados en crustáceos mediante la inyección de compuestos de carbono marcados radioactivamente con ^{14}C ; los AAI resultaron ser los mismos que en vertebrados, Met, Lys, Arg, Treonina (Thr), isoleucina (Ile), leucina (Leu), valina (Val), Histidina (His), Fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp).

La cisteína (Cys) y la tirosina (Tyr) son sintetizados a partir de Met y Phe respectivamente, así que se consideran como ahorradores, ya que su presencia reduce el requerimiento de estos dos AAI.

Para que una síntesis proteínica óptima tenga lugar, es necesario que todos los AA (bien sean obtenidos de fuentes proteínicas íntegras o sean suplementados en su forma libre a la dieta) estén presentes simultáneamente en el tejido en cantidades suficientes. Si dicho equilibrio no es alcanzado, entonces sobreviene un catabolismo de los AA, reflejándose en una disminución en el crecimiento y en la eficiencia alimenticia (Tacon, 1989). Generalmente los invertebrados a diferencia de los vertebrados tienen reservorios intracelulares de AA libres (AAL) más grandes y robustos, como en los crustáceos, adicionalmente la disposición de estos AA es distinta entre tejidos de la misma especie (Mente, 2003).

4.2.2 Ingredientes Típicos y Formulaciones Comerciales Clásicas.

Los productos de la industria pesquera como harina de pescado, de calamar y crustáceos se utilizaron en los inicios de la nutrición para organismos acuáticos como ingredientes cotidianos, obedeciendo a las observaciones de las cadenas tróficas y generando buenos resultados. La harina de pescado había sido el ingrediente predilecto en la formulación de alimentos para acuicultura, con un rango de inclusión en la industria de los alimentos para camarón que variaba entre 10 y 40% (Akiyama *et al.*, 1991). El incremento en los costos de la harina de pescado, como ya se comentó, ha llevado a buscar otras alternativas como fuente de proteína o expresado de otra forma de AA (Peñaflorida, 1989).

4.2.3 Ingredientes Alternos y su Relación Costo-Beneficio en el Alimento.

La alternativa más utilizada en Norte América para sustituir la harina de pescado es la pasta de soya con base en su valor nutricional, sin embargo las fuentes de proteína vegetal frecuentemente acarrear un problema, que es la deficiencia en AAI. La pasta de soya presenta menores contenidos de Met y Lys (Met 1.3 y Lys 6.2 %PC) con un balance de Lys/Met de 4.8 respecto de la harina de pescado (Met 2.8 y Lys 8.2 %PC), que tiene una menor proporción relativa de Lys/Met (2.9). Por lo tanto, para dietas formuladas con leguminosas como soya se presume una deficiencia en Met y Lys; además el uso de soya se asocia con una deficiencia en AA azufrados, en especial Met como el primer limitante (Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Fox *et al.*, 2006; Hardy, 2006). Inclusive estudios con isotopos estables utilizando modelos de mezclado han servido para estimar la contribución relativa del nitrógeno de soya con respecto al de pescado en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*, donde la contribución del pescado aumentó cuando disminuyó su inclusión (Gamboa-Delgado and Le Vay, 2009b), probablemente debido a que en este caso el pescado compense las deficiencias de los AAI en la soya.

El chícharo forrajero (*Pisum sativum*) ha sido exitosamente producido, con una distribución cosmopolita y a un bajo costo, por lo que ha sido de interés como una buena fuente de carbohidratos (principalmente almidones, 40-50%), minerales y proteína (21-25%)(Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Hickling, 2003). En la última década, la harina de chícharo y derivados de esta han sido exitosamente utilizados como una fuente de energía y proteína en remplazo de harina de pescado en dietas para acuicultura (Davies, Gouveia, 2010; Overland, Rresen, Storebakken, Penn, Krogdahl, Skrede, 2009; Thiessen, Campbell, Adelizi, 2003; Thiessen, Campbell, Tyler, 2003) especialmente para diferentes especies de camarones marinos, como el camarón tigre *Penaeus monodon* (Smith *et al.*, 2000; Bautista-Teruel *et al.*, 2003), el camarón azul del Pacífico *L. stylirostris* (Cruz-Suarez *et al.*, 2001) y *L. vannamei* (Davis *et al.*, 2002). El chícharo es una leguminosa con menor contenido de Met (1.16 %PC), pero presenta altos contenidos de Lys y Arg

(Lys 6.97 y Arg 10 %PC) con respecto a la pasta de soya (Lys 6.2 y Arg 7.36 %PC) y de Arg con respecto a la harina de pescado (Lys 8.2 y Arg 6.05 %PC).

A pesar de que la pasta de soya y el chícharo tienen bajos contenidos de ciertos AAI con respecto a las fuentes tradicionales, la digestibilidad de la proteína (98 y 90%, respectivamente) y de los AA de estos ingredientes es elevada en *L. vannamei* (Davis *et al.*, 2002; Cruz-Suárez *et al.*, 2009). Lo cual resulta importante resaltar debido a que el requerimiento solo se cubre con aquellos AA que están disponibles para el organismo consumidor.

4.2.3.1 Relevancia de la Metionina, Lisina y Arginina

La deficiencia de un AAI genera que la síntesis de proteína sea inhibida y las secuencias peptídicas incompletas se liberen para dar configuraciones inactivas de las proteínas que serán catabolizadas; la síntesis proteica se reactiva con la aportación del alimento (Cuaron, 2000; Mente, 2003). La importancia del AA Met radica en su función de AA iniciador de la traducción, a través de su derivado N-formil-Met. Por este motivo, la Met es indispensable aún en aquellos casos en los que no es por sí misma un integrante de la cadena de proteína (Degussa, 1989). A partir de la Met se puede formar cisteína, a través de sus fases intermedias S-adenosil-Met, homocisteína y cistationina, por el contrario, es imposible la síntesis de Met a partir de la Cys; la Cys a su vez es precursor de serina (Ser) y taurina. Por lo tanto, la presencia de Cys puede disminuir el requerimiento de Met de manera tal que en peces se han reportado reducciones del 60% en bagre, 44% en tilapia y 42% en trucha arcoíris (Wilson, 2003). La Met también participa en la biosíntesis de numerosos compuestos de importancia, tal como la colina, la creatina mediante la liberación de grupos metilos. La colina no puede llevar a cabo ninguna de las funciones de la Met en el metabolismo de las proteínas, pero su presencia en la dieta puede reducir o evitar el consumo de Met como donador de metilos (Cowey and Cho, 1993; Wilson, 2003; Michael *et al.*, 2006).

La Lys en conjunto con la Met sirven como precursores de carnitina, una molécula involucrada en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria.

Adicionalmente la Lys es el precursor de la hidroxilisina, envuelta en la producción de colágeno (Bicudo *et al.*, 2009), además de su función estructural. Existe un fenómeno llamado antagonismo Lys-Arg, que se debe al exceso de cualquiera de estos dos AA, se cree que la relación debe mantenerse cercana a 1 (Akiyama *et al.*, 1991). La Arg funciona como fosfágeno en crustáceos (Chen *et al.*, 1992a).

4.2.4 Otras Problemáticas Asociadas a la Utilización de Fuentes de Proteína Vegetal

Otras complicaciones asociadas al empleo de fuentes de proteína vegetal son relacionadas con la ausencia de atrayentes, el contenido de factores antinutricionales y la disminución en la estabilidad de los alimentos. En la pasta de soya los principales antinutricionales son los inhibidores de proteasas (tripsina y quimotripsina) y el ácido fítico (Treviño and Celis, 1999), por lo que se han sugerido inclusiones menores al 40% de la dieta y además así conservar la estabilidad de alimentos comerciales (Akiyama *et al.*, 1991). El chícharo tiene algunos antinutricionales, donde los más importantes son: el ácido fítico, dado que reduce la disponibilidad de nutrientes y las saponinas, que le confieren un sabor astringente (Valencia *et al.*, 2008); la selección genética ha llevado a obtener variedades con un menor contenido de antinutricionales y más ricas en proteína. Las problemáticas anteriormente planteadas se han intentado solucionar mediante procesos tecnológicos.

De un interés particular en los alimentos para camarón, han sido la estabilidad y la quimo atracción de las dietas una vez que son sumergidas en el agua; dado que el comportamiento en la alimentación del camarón facilita la lixiviación de ciertos componentes nutricionales de la dieta. La peletización aun cuando es un proceso eficiente y el más utilizado para la fabricación de alimento para camarón, presenta limitaciones; las principales son el contenido máximo de humedad (16-18%) y la temperatura (70-90 C) de la mezcla, cuando se utilizan ingredientes vegetales, cuya estructura y estabilidad depende del grado de gelatinización de los almidones de estos ingredientes (Muñoz, 2006). Por otro lado la extrusión es un proceso termoplástico presurizado, el cual permite

utilizar un contenido mayor de humedad (22-30%) a mayores temperaturas (115-120C) (Bortone, 2006). Debido a que el vapor llega hasta el núcleo del almidón, la naturaleza del proceso permite que sea completamente gelatinizado, inclusive hasta una degradación de la red de amilosa y amilopectina, lo que también reduce la estabilidad del pelet. Los efectos de los procesos térmicos sobre la gelatinización de los almidones y las propiedades nutricionales del chícharo han sido ampliamente investigados, donde se sugiere el autoclavado como el proceso casero más conveniente para explotar dichas propiedades (Yemane and Skjelvåg, 2003; Landa-Habana *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2010). Cualquiera que sea el método peletizado o extrusión; la post-cocción (pos condicionamiento) incrementa la estabilidad de los pelets en más del 20%, porque el tiempo de exposición al calor es mayor y la liberación de humedad es lenta, cerrándose la matriz y uniendo moléculas de almidones y proteínas (Bortone, 2006); adicionalmente el proceso desnaturaliza e inhibe la acción de factores anti nutricionales y deterrentes termolábiles.

Un alimento completamente exitoso debe ser bien consumido, lo que implica otra problemática con los alimentos a base proteínas vegetales. Aún cuando el perfil de AA de las proteínas es muy adecuado, no cuenta con quimioattractantes como los de las proteínas marinas (algas, peces y crustáceos). La solución que se ha encontrado a esta problemática es la de adicionar mezclas de hidrosolubles de pescado y otras fuentes marinas, vitaminas, aminos biogénicos y AA libres, para estimular el apetito del animal y el consumo de los alimentos (Alvarez, 2003).

4.3 Métodos Para Determinar el Requerimiento de Aminoácidos

4.3.1 Proteínas de Referencia Para el Estudio de Aminoácidos en Crustáceos

En el inicio de la nutrición de peces se consideró el perfil de AAI del huevo de gallina de referencia para la determinación de los requerimientos en acuicultura con base en los resultados obtenidos a partir de estudios en animales terrestres (Halver *et al.*, 1957;

DeLong *et al.*, 1958); eventualmente la caseína y la gelatina sustituyeron la proteína del huevo aunque se conservó el perfil de AA de éste. En el caso del camarón se observó que el consumo de la almeja de cuello corto (*Venerupis decussata*) mejoraba el rendimiento del camarón por lo que su perfil de AA se usó como referencia (Deshimaru, 1981; Teshima *et al.*, 2002), de igual forma posteriormente fue propuesto el perfil de AA del aislado del cangrejo *Cancer irrorotus* como referencia (Koshio *et al.*, 1989; Castell, 1990). Por otro lado la harina de pescado siempre ha dado buenos rendimientos en la producción de camarón.

4.3.2 Análisis del Perfil de Aminoácidos del carcas

Según el fundamento en el que el perfil de AA del producto de la síntesis de proteínas debe estar estrechamente relacionado con los requerimientos dietarios de la especie (Wilson and Poe, 1985a; Wilson and Poe, 1985b; Tacon, 1987a), se ha considerado al músculo de la cola de camarón o al camarón completo como una referencia para estudios de los requerimientos de camarón (Lim, 1993; Millamena *et al.*, 1996b; Millamena *et al.*, 1996a; Guillaume, 1997; Alam *et al.*, 2002). Al contrario de las harinas de pescado, las harinas comerciales de camarón no mostraron resultados positivos al ser utilizadas como perfil de AA de referencia, probablemente debido a que las harinas de camarón están hechas a base de subproductos del mismo; estos tienen grandes cantidades de quitina, que contribuye en una proporción importante a la proteína cruda de la harina (Guillaume, 1997; Huai *et al.*, 2009a).

Los perfiles de AA usados como referencia en el estudio de los requerimientos de *L. vannamei* han sido tomados de las recomendaciones de Akiyama *et al.*, 1991 (Fox *et al.*, 1995; Swick *et al.*, 1995; Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006), del músculo (Lim, 1993), y del cuerpo entero (Huai *et al.*, 2009b). Diferentes trabajos han sugerido que las recomendaciones de Akiyama *et al.*, 1991, están sobreestimadas para algunos AA (Cruz-Suarez *et al.*, 2000; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006).

El músculo podría mostrar un desbalance de AA debido a que considera los AA que intervienen en la síntesis de proteína pero excluye aquellos que desempeñan funciones metabólicas principalmente concentrados en el cefalotórax (Wilson and Cowey, 1985; Guillaume, 1997). Los altos niveles de correlación entre el perfil de AA del cuerpo entero y los requerimientos dietarios en carpa (Cowey and Tacon, 1982), en bagre de canal (Wilson and Poe, 1985a; Nose and Murai, 1990) y en salmón coho (Nose and Murai, 1990) sugieren que el perfil de AA del carcasa de camarón puede ser usado como patrón de referencia en el estudio en la determinación de los requerimientos de AA. En la Tabla 1 se presenta perfil de AA de diversas fuentes de proteína utilizadas como referencia en diversos estudios en camarón.

Tabla 1. Perfil de AA de proteínas de referencia (% de Proteína).

AA	Perfiles de referencia seguidos en estudios de aminoácidos														
	Huevo de gallina (Deshimaru, 1981)	Caseína libre de vitaminas (Koshio <i>et al.</i> , 1989)	Almeja de cuello corto (Deshimaru, 1981)	Concentrado de proteína de cangrejo (Koshio <i>et al.</i> , 1989)	Harina de calamar (Alamet <i>et al.</i> , 2002)	Harina de pescado premium (Villareal Cavazos, 2011)	Camarón (Boghen y castell, 1981) ¹	Camarón entero <i>P. monodon</i> (Deshimaru, 1981)	Musculo de cola de camarón <i>L. vannamei</i> (Lim, 1993)	Músculo de cola de camarón <i>P. monodon</i> (Millamena <i>et al.</i> , 1996)	Huevo de <i>Marsupenaeus japonicus</i> (Alam <i>et al.</i> , 2002)	Larva de <i>Marsupenaeus japonicus</i> (Alam <i>et al.</i> , 2002)	Cuerpo entero de juvenil de <i>Marsupenaeus japonicus</i> (Alam <i>et al.</i> , 2002)	Harina de camarón (Hess <i>et al.</i> , 2006)	Valores recomendados para la industria (Akiyama, 1991)
Met	3.16	2.94	2.03	2.05	4.76	2.9	2.7	3.09	2.96	2.5	2.38	2.82	2.89	1.79	2.4
Met+Cys	5.2	--	2.33	--	--	3.89	3.6	4.32	3.78	3.53	--	--	--	2.77	3.6
Lys	5.72	8.14	5.17	5.65	7.73	8.33	8.5	7.67	7.32	7.5	8.13	7.04	7.56	5.09	5.3
Thr	3.92	3.85	3.39	2.95	4.11	4.35	4.4	3.84	3.93	3.9	5.47	3.98	3.36	3.44	3.6
Arg	5.72	3.64	5.82	6.07	8.27	6.04	6.5	7.91	8.54	7.9	6.98	8.24	10.2	5.24	5.8
Ile	3.63	4.91	3.17	3.43	4.42	4.61	4.9	3.06	4.14	4.4	5.91	4.11	4.18	3.55	3.5
Leu	6.8	8.92	4.97	5.34	7.33	7.89	9.9	7.46	7.39	7.28	7.58	6.38	7.09	5.86	5.4
Val	4.05	6.05	3.27	3.54	4.13	5.55	3.4	3.04	4.32	5.1	6.8	4.82	4.18	4.34	4
His	1.8	2.79	1.31	2.01	2.47	2.6	1.1	1.76	2.21	2.45	3.47	2.24	2	1.99	2.1
Phe	4.36	5.07	2.73	3.21	4.24	4.25	4.9	4.13	4.14	4.15	4.62	4.29	3.69	4.29	4
Phe+Tyr	7.68	--	5.26	0	8.51	7.64	8.8	7.97	--	8.05	8.87	8.24	7.2	--	7.1
Trp	0.83	1.96	--	2.75	1.78	0.97	1.1	0.55	0.68	1.1	0.62	1.44	2.22	0.97	0.8

¹ En Guillaume (1997).

Otra forma de expresar el perfil AA del organismo es presentar cada uno de los AAI en relación al total de AAI (proporciones A/E). A partir del promedio de diferencias de las proporciones A/E entre el alimento y el organismo se obtiene el índice de AAI (Peñaflorida, 1989), que puede estimar a groso modo la calidad nutricional de un ingrediente o de la dieta.

4.3.3 Modelos Factoriales (Acreción de Aminoácidos en el camarón)

Los modelos factoriales aunque han sido poco implementados en la determinación de requerimientos nutricionales, son fáciles de construir y toman en consideración la calidad del agua, los estadios de vida, etc. Estos modelos toman como fundamento el concepto de proteína ideal, el cual explica que la relación adecuada entre los AA dietarios es aquella que se aproxima a la relación de AA encontrada proteína sintetizada. Por lo tanto la determinación de los requerimientos se basa en la cantidad de los AA depositados en el organismo (en un tejido específico o cuerpo entero) a través del crecimiento, mantenimiento, recambio y excreción, son calculados con base en el consumo y la ganancia en peso. Por otra parte no consideran la determinación independiente de cada AA, ni los cambios en la eficiencia de utilización de cada AA debido a las condiciones fisiológicas de crecimiento y el impacto de otros componentes dietarios (Shearer, 1995; Teshima *et al.*, 2001; Teshima *et al.*, 2002; Twibell *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 2009; Bureau, 2011). Los valores obtenidos mediante estos modelos generalmente son inferiores a los obtenidos con modelos dosis respuesta, debido a la cantidad de nitrógeno retenido por el organismo es pequeña en comparación con el nitrógeno dietario (Wilson, 2003).

4.3.4 Modelos de Dosis-Respuesta

El modelo de dosis-respuesta fue el primer método en utilizarse en peces por Halver y colaboradores (1957; 1958; 1986) y el más ampliamente utilizado, aunque ha

sufrido adecuaciones. En este método se busca obtener una respuesta fisiológica y zootécnica ya que a partir de una mezcla de proteínas puras (caseína, gelatina y AAL) se busca emular un perfil de AA de referencia (e. g. huevo de gallina) con excepción del AA investigado, del cual se evalúan niveles por debajo o por encima de la proteína de referencia. Se asocia una respuesta linear con respecto al incremento del AA evaluado, hasta que se cubre el requerimiento, entonces la respuesta puede presentar un plato (estancamiento) o invertirse (cuando la concentración del AA es tóxica). Las respuestas que se han relacionado con el cambio en el AA estudiado han sido los parámetros de crecimiento (ganancia en peso, tasa de crecimiento específico y la utilización de la proteína), el cambio en los aminoácidos libres del suero y el músculo y finalmente la tasa de oxidación del CO₂ de los que Wilson (2003) y Tacon (1987a) hicieron una revisión. Un mayor crecimiento se asocia con un nivel más cercano al requerimiento del AA en estudio, lo que permite la continua síntesis de proteína; un exceso en el cambio de los aminoácidos libres en el suero y el músculo se relaciona con un exceso en la suplementación del AA estudiado; en tanto que un exceso en la tasa de oxidación del CO₂ se liga con una mayor tasa metabólica y la excreción de nitrógeno, ligada al exceso del AA estudiado.

El análisis matemático de estos modelos experimentales ha cambiado desde el cálculo del requerimiento a partir del gráfico de Alquist, pasando por la estimación mediante una regresión del gráfico de Alquist, el modelo de línea quebrada y el análisis de regresión de segundo grado (Halver *et al.*, 1957; Santiago and Lovell, 1988; Lovell, 1991; Sterling *et al.*, 2003).

El método dosis-respuesta se ha modificado eventualmente y empleado en diferentes especies de camarón; para juveniles de *Penaeus monodon* se han determinado los requerimientos de Arg (Chen *et al.*, 1992a; Millamena *et al.*, 1998) Met, Lys, Thr, His, Ile, Leu, Phe y Trp (Millamena *et al.*, 1996b; Millamena *et al.*, 1996a; Millamena *et al.*, 1997; Millamena *et al.*, 1998; Millamena *et al.*, 1999) y para juveniles *Litopenaeus vannamei* los requerimientos de Lys (Fox *et al.*, 1995) y de Thr en agua dulce (Huai *et al.*, 2009b).

4.3.5 Modelos a Base de la Técnica de Dilución de Dietas.

Estos modelos consisten en la utilización de dos dietas de referencia, una con alto contenido de proteína y otra con nulo o bajo contenido, ambas con el mismo perfil de AA, con excepción del AA estudiado. Estas dietas se mezclan en diferentes proporciones para generar niveles crecientes de proteína y en cada nivel de proteína se modifica el contenido del AA de estudio (Sterling *et al.*, 2003). Utilizando estos principios y una descripción matemática de la proteína depositada en función de la ingesta del AA más limitante en la dieta de nitrógeno adecuado se han podido determinar los requerimientos para diferentes AA en *Oreochromis niloticus* (Liebert and Benkendorff, 2007; Liebert, 2009) y Thr en *Salmo salar* (Abboudi *et al.*, 2007). Los principios de la dilución generalmente no son fáciles de reconocer y pueden confundirse con una mezcla o variaciones de los diseños de dosis respuesta o factorial.

4.4 Fuentes de Aminoácidos Empleadas en Estudios de Requerimientos

4.4.1 Utilización de Aminoácidos Libres en Dietas Puras

Los primeros estudios de requerimientos de AA se realizaron mediante inclusión de AAC emulando las proteínas de referencia (Deshimaru and Kuroki, 1974), o de la mezcla de proteínas puras e incompletas (caseína y gelatina) y estos AA. Los AAC si bien facilitan la preparación de las dietas con diferentes niveles de los AA que se quieren evaluar en los ensayos de dosis-respuesta; generan problemas metodológicos asociados con 1) la disponibilidad reducida de AAI debido a su lixiviación 2) la presencia de fuentes extrínsecas de AAL, adicionales al AA estudiado y 3) diferentes velocidades de absorción, que dan como resultado la ineficiencia de estos en su forma natural (Fox *et al.*, 1995; Guillaume, 1997). Estas problemáticas se explican debido a que las propiedades físicas los AAC son determinadas a partir de las fuerzas electrostáticas fuertes entre grupos funcionales con cargas negativas y positivas, lo que les brinda un punto de fusión

elevado, pero alta solubilidad de la misma forma que las sales comunes (Lehninger *et al.*, 1995).

En los estudios de acuicultura se ha reportado el uso de los dos estereoisómeros D y L de la Met, se considera que existe la misma capacidad de utilización de cualquiera de la D-Met o L-Met en los organismos acuáticos ya que está presente la isomerasa para convertir los isómeros D en L (Ruiz *et al.*, 1994). Por otra parte la Lys cristalina es comercializada en su isómero L hidrociorado (L-Lys-HCl), diseñada para la industria alimentaria con una disponibilidad del 100% (ADM, 2006).

El análogo de Met, ácido 2-hidroxi-4-metiltio butanoico (HMTBA), regularmente es incorporado como aditivo en dietas elaboradas para aves y cerdos, para resolver la problemática que resulta de la deficiencia en Met en proteínas de origen vegetal. En estos animales el HMTBA se absorbe en el tracto digestivo y por difusión facilitada (pasiva) pasa al sistema circulatorio (Dibner, 2003). La ruta metabólica por la cual los isómeros de HMTBA se transforman en L-Met ha sido descrita ampliamente; de manera tal que se conoce que la D-hidroxiácido deshidrogenasa transforma el isómero D-HMTBA en ceto-Met dentro de la mitocondria, mientras que en el peroxisoma se encuentra la L-hidroxiácido oxidasa que actúa sobre el isómero L-HMTBA, a su vez la ceto-Met es transaminada a L-Met. Se ha confirmado la presencia de estas enzimas en el hepatopáncreas de diferentes crustáceos (Ruiz *et al.*, 1994).

4.4.2 Utilización de Aminoácidos Encapsulados

Con la finalidad de reducir al máximo la pérdida de AAL se ha intentado desarrollar fuentes de AA estables: 1) empleando la encapsulación de AAL en matrices de polímeros gelatinizados (Millamena *et al.*, 1996b; Millamena *et al.*, 1996a; Millamena *et al.*, 1997; Millamena *et al.*, 1998; Millamena *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2004b; Onal and Langdon, 2005); 2) sintetizando moléculas de mayor peso molecular como poli péptidos (Divakaran, 1994).

4.4.3 Aminoácidos Ligados Covalentemente

Algunos investigadores han practicado diferentes procesos para ligar covalentemente aditivos altamente solubles a un compuesto medianamente soluble para disminuir la pérdida por lixiviación en el alimento y que sea de fácil absorción, después de ser hidrolizados en la digestión química. Fox *et al.* (1995) reporta AA ligados covalentemente a proteínas (Lys ligada a gluten de trigo), por otro lado se han reportado aditivos como vitaminas, factores de crecimiento y AA unidos a sales minerales con la finalidad de disminuir la lixiviación (Fogle *et al.*, 1999; Novus 2005, 2005b; Vazquez-Añon y Guisen 2006).

El hidroxianálogo de Met unido a calcio (MHA) en su estructura química consiste de dos moléculas de (HMTBA) ligadas de forma covalente a un átomo de calcio $[\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CHOHCOO}]_2\text{Ca}$; como suplemento alimenticio aporta un 12% de calcio; en tanto un 84% de Met neta, en su forma HMTBA, tiene una eficiencia de deposición de aproximadamente el 49.4% en la proteína cruda de animales monogástricos terrestres de granja (NOVUS INTERNATIONAL INC., 2005). La suplementación de HMTBA en dietas bajas en el contenido de Met ha mejorado el rendimiento de *P. monodon* (Swick *et al.*, 1995) y *L. vannamei* (Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006).

En dietas formuladas para *L. vannamei* se reportó que no hay diferencias en la eficiencia de L-Met, DL-Met o MHA al cubrir un nivel de 1% de Met total en la dieta (3.3% de la proteína cruda, incluyendo la actividad de Met del MHA) sobre el crecimiento del camarón (Forster and Dominy, 2006); fenómeno que también se presentó al comparar la DL-Met, el HMTBA unido a Cu y la polymet con niveles de Met total de 2.88%PC, aunque incluso una dieta basal con 1.26% de Met (% de proteína) puede sostener un crecimiento adecuado en el camarón (Fox *et al.*, 2006). Por otra parte la digestibilidad del HMTBA unido a diferente minerales (Ca, Zn, Cu, Mg y Mn) mostró ser igual a la Met de la proteína integra en el alimento, pero ambas fueron inferiores a la digestibilidad de la DL-Met; se presume que la lixiviación de la DL-Met en las heces y alimento haya sobreestimado la digestibilidad (Fogle *et al.*, 1999; Fox *et al.*, 2006).

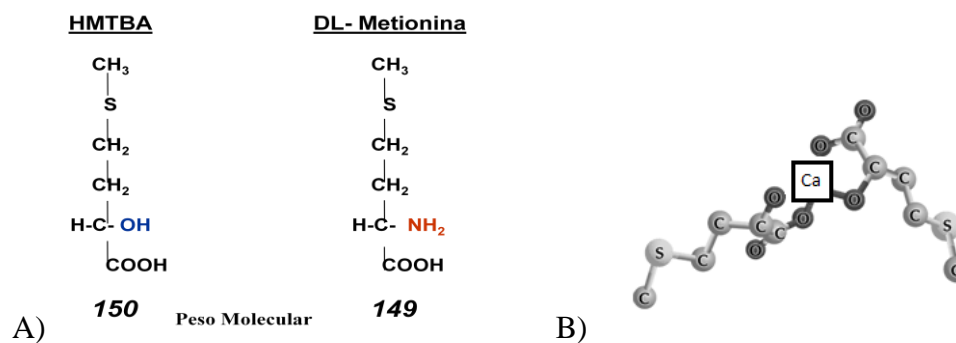


Figura 1. A) Fórmulas semidesarrolladas del hidroxianálogo ácido 2-hidroxi-4-metiltio-butanoico (HMTBA) y de la DL-Met. B) Esquema de la molécula del hidroxianálogo unido a calcio, MHA (Novus, 2005).

4.4.4 Utilización de proteínas íntegras

Los juveniles de peces o camarones alimentados con raciones en las que una porción significativa de la proteína dietaria es suministrada en forma “libre” como AAC, generalmente muestran un crecimiento subóptimo y una eficiencia de conversión alimenticia baja, comparada con animales alimentados con proteína íntegra (en las que los AA son elementos constitutivos de éstas) o donde ésta representa la mayor parte de la proteína dietaria (Deshimaru and Kuroki, 1974).

4.5 Estudios previos en el requerimiento de Met en camarones penaeidos

En la década de los 90 Akiyama *et al* (1991) proponen una recomendación del perfil de AA para la alimentación de penaeidos, la cual se infiere fue calculada a partir de la composición corporal de camarón. En la misma década aparentemente el problema de la lixiviación de AAC se reduce a partir del desarrollo de encapsulados en polímeros de proteína o carbohidratos, lo que permite la determinación de los requerimiento en *P. monodon* (Millamena *et al.*, 1996a). Por otra parte los requerimientos de *M. japonicus* se determinaron a partir de la acreción corporal (Teshima *et al.*, 2002). Recientemente se

han realizado intentos por determinar el requerimiento de Met en *L. vannamei* mediante estudios de dosis respuesta utilizando DL-Met libre y MHA, sin embargo no se ha encontrado una respuesta significativa o la cantidad estimada es mayor a las recomendaciones de Akiyama (Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006). Fox *et al.* (2007) hace una revisión de los valores determinados o recomendados para diferentes especies de camarón. En tanto Palma (2006) determina el requerimiento de Met para *Palaemonetes varians* utilizando un modelo de dosis-respuesta analizado por línea quebrada. Richard *et al.* (2009) empleando un modelo factorial hace una revaloración del requerimiento de Met para *P. monodon* a través de modelos regresión lineal y de línea quebrada. En la tabla 2 se presentan el requerimiento de Met y AAS recomendados para diferentes especies de camarones penaeidos.

Tabla 2. Requerimientos de metionina y AAS recomendados, calculados o determinados para camarón.

Referencia	Especie	Metionina (% proteína)	AAS (% proteína)
Deshimaru (1981) *	<i>M. japonicus</i>	2.9	3.1
Akiyama <i>et al.</i> (1989)	Camarón penaeido	2.4	3.6
Liou y Yang (1994) *	<i>P. monodon</i>	--	4.0
Chen (1998) *	<i>P. monodon</i>	2.0	2.7
Millamena <i>et al.</i> (1996) *	<i>P. monodon</i>	2.4	3.5
Teshima <i>et al.</i> (2002) *	<i>M. japonicus</i>	1.3	2.6
Auburn-TAMUCC*	<i>L. vannamei</i>	<1.3	<2.7
Palma (2006)	<i>Palaemonetes varians</i>	2.4	--
Richard (2009)	<i>P. monodon</i>	2.9	3.7

* En Fox *et al.*, 2006.

4.6 Dietas Preliminares Usadas Para Determinar el Requerimiento de Metionina

En la determinación del requerimiento de Met para *P. monodon*, Millamena *et al.* (1996a) emplearon una dieta semi-pura a base de caseína-gelatina (2:1) adicionada con

AAC para emular el perfil del camarón (37% de PC) con niveles crecientes de Met (2.0-3.0% de PC) encapsulada en una matriz de CMC.

En la determinación del requerimiento de los AA para *P. japonicus* mediante la acreción del camarón se utilizaron dos dietas completas, semipuras, con altos contenidos de proteína y AAI; una a base de caseína (50%) y calamar (5%), mientras la segunda a base de harina de pescado (53%) y calamar (6%) (Teshima *et al.*, 2002).

En la determinación del requerimiento de Met para *P. varians* (Palma *et al.*, 2006) se utilizó una dieta a base de harina de pescado (13.5%), gluten de trigo (10%), gelatina (2.5%) y AAL (23.5%) con un contenido de 44.28% de proteína y 1.13% de Met (% de PC), la cual se adicionó con DL-Met en sustitución de harina de trigo para obtener niveles de 1.58, 2.03, 2.48 y 2.94%.

En la reevaluación del requerimiento de Met para *P. monodon* Richard *et al* (2009) utilizó dietas puras a base de caseína (6.2-31%), AAL (4.5-22.5%) y solubles de pescado (2%) con niveles de 5-54% de proteína y 1.96-3.26% de Met (% de PC).

Han habido varios intentos por determinar el requerimiento de *L. vannamei*. En un primer intento Vazquez-Añón (2004) utilizó una dieta a base de trigo duro (43%), pasta de soya (26%) harina de pescado (15%), solubles de menhaden (5%), y Arg, Lys y Thr (0.08, 0.07 y 0.06% respectivamente) con un contenido de 33% de proteína y 1.97% de Met (% de PC) inferior al 2.40% recomendado por Akiyama (1991). Esta dieta de base fue suplementada con HMTBA para cubrir 2.27, 2.58 y 2.88% de Met total (% de PC).

Por otro lado Forster (2006) utilizó una dieta a base de proteínas vegetales, trigo entero (48.6%), pasta de soya (29.3%), gluten de trigo (4%), levadura (5%), sin embargo fue adicionada con harina de calamar (2%) como atrayente y una mezcla de AAC (0.5% de Arg, 0.5% de Lys-HCl, 0.2% de Thr y 1% Glu) para obtener un contenido de 30% de proteína cruda, 1.5% de Met (% de PC) y 3.17% de Cys. Eventualmente el ácido glutámico fue sustituido por L-Met, DL-Met y HMTBA para llegar a 2.89% de Met total y así cubrir los niveles sugeridos por Akiyama (1991).

Fox *et al* (2006) realizó una serie de experimentos para medir la digestibilidad y el crecimiento con el objetivo de determinar el requerimiento de Met. La dieta de base usada para evaluar la digestibilidad fue formulada a base de pasta de soya (66.70%) y se suplementó a niveles de 1.63% de Met total con DL-Met, HMTBA unido a diferentes minerales (Ca, Mn, Cu y Zn) o Polymet en sustitución de almidón de trigo. La primer dieta de tres, utilizadas para evaluar el crecimiento, fue a base de pasta de soya (25%) y subproductos de ave (25.5%) con 36% de proteína y 2.8% de AAS totales, que fue adicionada con diferentes niveles de Met de los que no se da descripción. La segunda dieta fue a base de pasta de soya (53.2%) y subproductos de ave (6%) con 32% PC, 1.33% de Met y 2.88% de AAS totales, la cual fue suplementada hasta 3% de AAS totales con DL-Met, HMTBA-Cu y Polymet. La tercer dieta fue a base de pasta de soya (44.60%), subproductos de pollo (6%) y gelatina (5%) con 32% PC, 1.26% de Met y 1.36 de Cys, la cual fue suplementada hasta totales con DL-Met (1.41 y 1.57% de Met total) y con HMTBA-Cu (1.35, 1.45, 1.55 y 1.65% de Met total). Ninguna de las dietas anteriores cubrió los niveles recomendados para Akiyama (1991) de 2.4% de Met y 3.6% de AAS totales.

5. MATERIAL Y MÉTODO

Se realizaron 11 experimentos para validar cada una de las hipótesis planteadas en el presente trabajo. A continuación se describen los productos evaluados, las formulaciones y fabricación de los alimentos, los análisis químicos y físicos, las características de los organismos, las condiciones experimentales, los diseños empleados, las variables evaluadas y los análisis estadísticos empleados. En la Figura 2 se presenta un resumen esquematizado de las dietas de base deficientes en Met y los productos evaluados en la presente tesis.

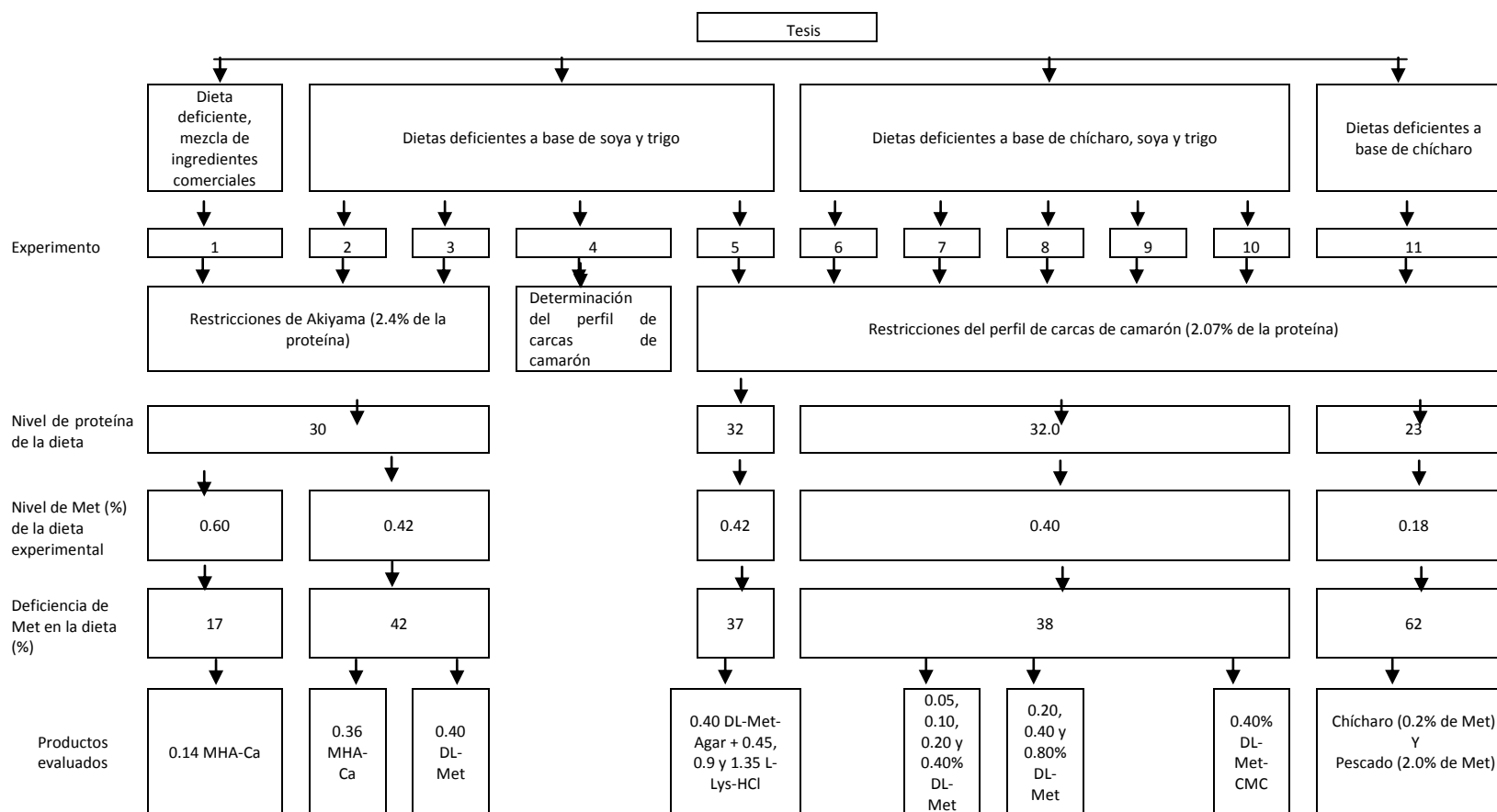


Figura 2. Resumen de las dietas de base deficientes en Met y de productos evaluados en los diferentes experimentos realizados en el desarrollo de la tesis.

5.1 Productos Evaluados.

5.1.1 MHA® (methionine hidroxy analog, calcium)

Es la presentación granulada de la sal de calcio del ácido 2-hidroxi-4-metil tio-butanoico (HMTBA) de la compañía Novus International. Es utilizado como precursor de DL-Met en animales de engorda, con una actividad de Met calculada en 84%. Adicionalmente el producto aporta un 12% de Ca disponible y se calcula un contenido de humedad del 2.5%. Es un polvo color claro, con olor a azufre, que presenta una densidad de 700-800 Kg/m³, tiene una solubilidad de 7.4g/100g a 25C y al 5% (P/V) presenta un pH 11. En aves se calcula un contenido de energía metabolizable de 4,014Kcal/Kg, mientras que en cerdos es de 4,395 Kcal/Kg. En peces se recomienda una inclusión de 0.025-0.5% del alimento mientras que en crustáceos es de 0.025-0.25% (NOVUS INTERNATIONAL INC., 2006). La identificación e información del producto se encuentra en la Figura 3, las hojas completas de especificaciones del producto se encuentran en el Anexo 1.

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

Date: February 19, 2007

Page 1 of 7

MHA®
METHIONINE HYDROXY ANALOGUE, CALCIUM

1. PRODUCT IDENTIFICATION

Synonyms: 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid, calcium salt
methionine hydroxy analogue, calcium salt

Chemical Formula: $[\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CHOHCOO}]_2\text{Ca}$

CAS Reg. No.: 4857-44-7

Product Use: Animal Feed Supplement

NOVUS INTERNATIONAL, INC.
530 Maryville Centre Drive
St. Louis, MO 63141-5862
Telephone: 314-576-8886
For Emergencies: 800-568-0088
CHEMTREC: 800-424-9300

NOVUS INT'L (CANADA) INC.
2910 South Sheridan Way
Oakville, ON, CAN L6J 7J8
Telephone: 905-845-1878
CANUTEC: 613-996-6666

NOVUS Internacional de Mexico
Bosque de Ciruelos, 194 PH
Col. Bosques de las Lomas
Mexico, D.F. 11700
Telephone: 01-55-5251-5433
SETIQ (in Mexico): 01-800-002-1400

2. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

<u>Chemical Ingredients:</u>	<u>CAS Number</u>	<u>% by weight</u>	<u>OSHA PEL</u>	<u>ACGIH TLV</u>
Methionine Hydroxy Analogue, calcium	4857-44-7	90-98	N.E.	N.E.
Calcium Sulfate	7778-18-9	1-4	Total 15 mg/m3 Respirable 5 mg/m3	Total 10 mg/m3
Calcium Hydroxide	1305-62-0	1-5	5 mg/m3	5 mg/m3

N.E. = Not Established

Figura 3. Hoja de especificaciones de la MHA-Ca utilizada en la tesis

5.1.2 DL-metionina

Es un AA esencial con un peso molecular de 149.21 g/mol, sintetizado industrialmente, el cual es usado como suplemento alimenticio para animales de engorda, principalmente mono gástricos. La DL-Met utilizada en la tesis fue obtenida de la empresa Evonik-Degussa (Evonik-Degussa GmbH, Rodenbacher Chaussee, Hanau-Wolfgang), la cual mostró una pureza de 99.67%. La DL-Met es un polvo cristalino de color claro, con una densidad de 700Kg/m³, con un tamaño de partícula de 0-1000 µm y una solubilidad en agua a 20C de 30g/L. La biodisponibilidad del AA es de 100%; en aves se calcula 5,020 Kcal/Kg de energía metabolizable, mientras que en cerdos es de 5,280 Kcal/Kg. En la Figura 4 se muestra el certificado de análisis de la DL-Met empleada en la tesis, mientras la hoja de especificaciones se presenta en el Anexo 2.

Sep. 3. 2008 11:53AM G600 WHSE METHIONINE

EA. 2581
PNA 470
10 Sept 08

No. 8548 P. 4/4

4201 Degussa Road
THEODORE AL 36582ATTN.:
DEGUSSA MEXICO
C/O SEEGROVE INT. SHIPPERS INC
13601 NORTH LAMAR DR BUILDIN
LAREDO TX 78045

Certificate of Analysis

Date : 09-03-2008
 Material Name : DL-METHIONINE 1000 KG BULK BAG
 Material Number : 10000078
 Batch Number : 080828M10
 Quantity : 19,000.000 KG

Production Date : 08-28-2008
 Scheduled Delivery Date : 09-05-2008
 Expiration Date : 08-27-2013
 Container/Rail Car No. : 40589
 Customer PO/ Ref No. : PNA-47008
 Evonik Degussa Sales Order : 459435
 Bill of Lading No. : 80637382 - 000010
 Seal No. : 00010336

Product Specification

Parameters	Methods	Spec.Limits		Actual Values	Unit
		Min	Max		
Assay	Method MT01	98.00		98.87	%(m)
Loss on drying	Method XLD1		0.30	0.06	%
Ash	Method XA01		0.50	0.05	%

Figura 4. Certificado de análisis de la DL-Met empleada en la presente tesis.

5.1.3 L-Lys-HCl (lisina mono hidro-clorada)

La L-Lys mono hidroclorada es un producto diseñado para la industria alimentaria por la empresa DMS (Archer Daniels Midland Company, Decatur, IL, USA) con una pureza de 98.5%; aporta un 78% de L-Lys, que es biodisponible en 100%, aunque presenta un contenido de 19.7% de ácido clorhídrico y 1.5% de humedad. La HCl-L-Lys es un polvo claro que presenta un peso molecular de 182.65g/mol, con una densidad de 640-710 Kg/m³, con un tamaño de partícula de <1.19 mm y una solubilidad en agua a 25C de 500-600 g/L. La digestibilidad del AA es de 100%; en aves se calcula 3,990 Kcal/Kg de energía metabolizable, mientras que en cerdos es de 4,250 Kcal/Kg. En la Figura 5 se muestra la hoja de especificaciones de la L-Lys-HCl.



ADM L-LYSINE HCl

L-Lysine Monohydrochloride 98.5% Feed Grade
 Archer Daniels Midland Co. Specialty Feed Ingredients Division
SpecialtyFeedIngredients@admworld.com

Description

ADM L-Lysine monohydrochloride is a high quality, granular product specifically designed for the feed industry. Produced from advanced technology, this product is composed of 100% isomerically pure L-Lysine, which translates into 100% bioavailability for swine, poultry, and other animals.

Ingredients

L-Lysine monohydrochloride

Guarantee

L-Lysine monohydrochloride, minimum	98.5%
L-Lysine	78.8%
Moisture, maximum	1.5%

Chemical Characteristics

Formula	$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$
Molecular Weight	182.65
Nitrogen, %	15.34
$[NH_3^+ - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH - COO^-]Cl^-$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad NH_3^+$	

Nutritional Specifications

L-Lysine Content	78.8%
HCl Content	19.7%
Crude Protein [N x 6.25]	94.4%

Metabolizable Energy

	kcal/kg	MJ/kg	kcal/lb
Poultry	3990	16.7	1810
Swine	4250	17.8	1932

Storage

Store in unopened original packaging in cool, dry area.
 Shelf life is 2 years from date of manufacture.

Packaging & Product Code

25 kg bags	(035150)
1000 kg totes	
Bulk trucks	

Figura 5. Hoja de especificaciones de la L-Lys-HCl empleada en la presente tesis.

5.1.4 Encapsulados en agar

En los experimentos 3 y 5 se evaluó la DL-Met (Evonik Degussa) encapsulada en una matriz de agar-agar (Dibico S.A. de C.V., D.F., México) como suplemento para dietas deficientes en Met; adicionalmente en el experimento 5 se evaluó un encapsulado de Lys: L-Lys-HCl (ADM) en la misma matriz.

Los encapsulados de Met (99.9% DL-Met) y de Lys (78.8% de L-Lys) con una relación 1AA:1agar se prepararon de la siguiente forma: se disolvieron 30g del AA en 0.15 L de agua destilada, por separado se disolvieron 30g de Agar en 1.35L de agua destilada en matraces Erlenmeyer, los cuales en una parrilla eléctrica a baja intensidad y con agitación magnética se dejaron en ebullición de uno a dos minutos. El contenido de

los matraces se vertió en un vaso de precipitados de 3.5L y se enfrió por agitación magnética entre los 60 y 45°C. Se agregaron los AA disueltos y se dejó enfriar hasta los 40°C, se vertió en charolas de aluminio y se dejó gelatinizar. Una vez así, se congeló y se liofilizó. La matriz obtenida se molió en una licuadora (kitchen assistant 2774, Sunbeam Latin American, LLC.). En el caso de la Lys se fabricaron 3 lotes los cuales se mezclaron. Para el encapsulado con una relación 2Met:1agar en el experimento 3, solo se duplico la cantidad de Met.

5.1.5 Encapsulados en CMC

En el experimento 10 se evaluó un encapsulado de DL-Met en carboxi-metil celulosa (Grupo Dermet de México S.A. de C.V., D.F., Nuevo León, México). La preparación del encapsulado de Met en CMC consistió en colocar 20g del AA en un vaso de precipitados, después se agregó agua destilada, de 10 en 10mL hasta hidratar; por separado un vaso de precipitados con 20mL de agua se colocó en un baño de agua a 60°C, se agregaron 10g de CMC, se mezclan añadiendo agua (de 10 en 10mL) hasta gelificar todo el material. Ya gelificada la CMC y los AA hidratados, se combinaron (utilizando de manera intermitente el baño a 60°C), finalizando con una matriz translúcida.

5.2 Ingredientes usados como principal fuente de proteína en las dietas control

deficientes en Met

5.2.1 Pasta de soya y aislado de soya

La pasta de soya se obtuvo de la empresa Proteínas Naturales S.A. de C.V. (Nuevo León, México). Por otra parte, el aislado de soya se obtuvo de Cargill

Incorporated, a través de un proveedor en México (Técnicas Nutricionales S.A.). La composición proximal de la pasta de soya y el aislado de soya se determinaron en el Laboratorio de Maricultura. Los perfiles de AA de las proteínas de la pasta de soya y del aislado de soya fueron analizados por la compañía Evonik Degussa (Laboratorio Hanau, Alemania) (Cruz-Suárez *et al.*, 2009). La composición proximal y el perfil de AA se presentan en la Tabla 3.

5.2.2 Harina de trigo

La harina de trigo se obtuvo de la compañía Molino Sant Joan S.A. de C.V. (Monterrey, México), en tanto el gluten de trigo fue suministrado por Almidones y gluten S.A. (D.F., México). La composición proximal de la harina y del gluten de trigo se determinó en el Laboratorio de Maricultura. Los perfiles de AA de la harina y del gluten de trigo fueron determinados por la compañía Evonik Degussa (Laboratorio Hanau, Alemania), los cuales se presentan en la Tabla 3 acompañados de la composición proximal.

5.2.3 Harina de Chicharo

La harina de chícharo amarillo fue proporcionada por Saskatchewan wheat pool. La composición proximal del chícharo amarillo se analizó en el laboratorio de Maricultura (Cruz-Suarez *et al.*, 2001). El perfil de AA de la proteína del chícharo amarillo usado fue el reportado por Hickling *et al* (2003) después de ser ajustado al porcentaje de PC analizado y se presenta la Tabla 3.

El chícharo verde entero, de origen canadiense, se obtuvo de la empresa Alta Calidad de Semillas y Granos S.A. de C.V. (D.F., México) y se pulverizó en un molino (Cyclotec sample mill 1096, Tecator) a un número de malla 50 (300 μ m) para obtener la harina de chícharo verde. La composición proximal de la harina de chícharo verde se

analizó en el Laboratorio de Maricultura, mientras el perfil de AA de la proteína de este ingrediente se determinó en el laboratorio químico de la Estación Experimental de Agricultura, Universidad de Missouri-Columbia y se muestra en la Tabla 3.

5.2.4 Harina de pescado

La harina de pescado fue producida con calidad Prime a partir de sardina en Sonora y fue proporcionada por Alimentos Costamar S. A. de C.V. (Sonora, México). La composición proximal de la harina de pescado se analizó en el Laboratorio de Maricultura, mientras el perfil de AA de la proteína fue determinado en el laboratorio químico de la Estación Experimental de Agricultura, Universidad de Missouri-Columbia y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición proximal, contenido de AA y coeficientes de digestibilidad de la materia seca, proteína y AA en los ingredientes usados como fuente de proteína en la dietas control deficientes en Met (% de la base húmeda).

Contenido (% bh)	Pasta de soya	Aislado de soya	Harina de trigo	Gluten trigo	Chícharo Amarillo	Chícharo verde	Lupino	Harina de pescado	Harina de kelp	Harina de crustaceo	Harina de levadura	Alimento reprocesado	Trigo
Humedad	6.1	4.6	12.2	7.8	10.4	12.5	7.1	6.9	10.0	9.0	9.0	10.0	12.2
Proteína	48.9	84	13.1	82.6	20.2	24.5	45.9	69.4	7.0	43.0	38.7	31.5	13.1
Lípidos	0.9	0.1	1.3	0.6	1.9	1.8	7.4	5.6	0.5	3.1	2.9	8.2	1.3
cenizas	5.8	6.5	0.6	1.1	3	2.5	3.4	15.7	23.7	12.1	5.7	10.2	0.6
Fibra	4.1	0.4	0	0.9	3.4	1.6		0.6	2.3	3.1	2.0	3.0	0
ELN	34.2	4.4	72.8	7	61.2	57.2	36.1	1.8	52.9	28.5	41.0	37.2	72.8
Energía (Kcal/g)	4.3	5.3	4.18	4.91	4.05	3.96	4.5	4.46	3.46	4.77	5.05	17.60	4.18
Met	0.6	1.1	0.2	1.2	0.2	0.2	0.2	2	0.1	0.8	0.6	0.6	0.2
Cys	0.7	0.9	0.3	1.7	0.3	0.4	0.7	0.7	0.1	0.4	0.5	0.4	0.3
Met+Cys	1.3	2	0.5	2.9	0.5	0.6	0.9	2.7	0.2	1.2	1.1	1.0	0.5
Lys	3	5	0.3	1.2	1.4	1.7	2.1	5.8	0.3	2.2	2.6	1.6	0.3
Thr	2	3.2	0.3	2	0.8	0.8	1.6	3	0.3	1.6	1.8	1.8	0.3
Arg	3.6	6.2	0.5	2.8	1.6	2.2	5.3	4.2	0.3	2.2	2.5	1.1	0.5
Ile	2.7	3.9	0.4	2.9	0.9	1.1	1.7	3.2	0.3	1.7	1.7	1.2	0.4
Leu	3.7	6.5	0.9	5.5	1.4	1.8	3.2	5.5	0.5	2.7	2.5	2.1	0.9
Val	2.3	4.1	0.5	3.1	1	1.2	1.5	3.9	0.4	2.1	2.1	1.4	0.5
His	1.3	2.1	0.3	1.7	0.5	0.6	1.0	1.8	0.1	0.9	1	0.7	0.3
Phe	2.5	4.5	0.6	4.1	0.9	1.2	1.7	3	0.3	2.1	1.6	1.4	0.6
Gly	2.1	3.6	0.5	2.6	0.8	1	1.8	4	0.3	2.5	1.9	1.9	0.5
Ser	2.5	4.5	0.6	3.8	0.7	0.9	2.3	2.6	0.3	0.6	1.8	1.3	0.6
Pro	2.4	4.2	1.5	10.3	0.8	1	2.8	2.7	0.3	1.9	2	2	1.5
Ala	2.2	3.6	0.4	2	0.8	1	1.5	4.1	0.4	2.4	2.3	1.6	0.4
Asp	5.7	10.3	0.5	2.5	2.2	2.7	5.0	6.4	0.7	3.8	3.5	2.6	0.5
Glu	9.1	16.8	4.5	28.6	3.2	3.9	10.3	8.5	0.9	5.1	5.7	5.4	4.5
Trp	0.7	1.1	0.1	0.8	0.2	0.2	0.0	0.7					0.1
Tyr				2.7	0.6	0.7	1.7	2.4					
Tau					0.1	0.1		0.4					

Continuación tabla 3

Contenido (% bh)	Pasta de soya	Aislado de soya	Harina de trigo	Gluten trigo	Chícharo Amarillo	Chícharo verde	Lupino	Harina de pescado	Harina de kelp	Harina de crustaceo	Harina de levadura	Alimento reprocesado	Trigo
Coeficientes de digestibilidad de los nutrientes													
Materia Seca	82	92	95	95	42	42	62	85	94	94	82	71	83
Proteína	98	97	88	88	90	90	94	86	100	98	91	78	75
Energía (Kcal/g)					72	72	73						
Met	97	95	99	99	95	95	100	97	100	98	96	73	86
Cys	92	95	87	87	92	92	94	87	95			79	85
Lys	97	97	81	81	94	94	93	99	100	93	93	82	63
Thr	94	94	48	48	89	89	92	96	100	91	85	78	46
Arg	99	98	93	93	96	96	99	98	100	94	92	80	81
Ile	96	95	78	78	94	94	97	96	100	92	90	82	68
Leu	94	94	86	86	93	93	96	96	100	92	89	83	79
Val	95	94	72	72	93	93	94	95	100	90	88	81	62
His	95	96	90	90	92	92	96	97	100	87	88	80	83
Phe	95	95	90	90	93	93	95	94	100	91	89	80	84
AAE	96	95	81	81				97	100	92	90	81	2
Gly	100	98	89	89	92	92	93	63	100	100	99	70	82
Ser	95	95	73	73	92	92	95	77	100	88	85	79	73
Pro	98	98	100	100	92	92	100	78	100	98	92	78	100
Ala	98	95	59	59	92	92	93	71	100	93	90	75	53
Asp	97	97	50	50	92	92	95	77	100	92	89	79	52
Glu	98	98	100	100	92	92	98	86	100	94	90	87	99

La composición proximal y el perfil de AA de los ingredientes fueron previamente determinados.

Los coeficientes de digestibilidad para pasta y aislado de soya (Cruz-Suárez *et al.*, 2009) trigo entero, harina y gluten de trigo (Nieto-López *et al.*, 2011), lupino (Smith *et al.*, 2007), harina de pescado, harina de kelp, harina de crustáceo, harina de levadura y alimento reprocesado (Villareal Cavazos, 2011) fueron determinados en *L. vannamei*; los coeficientes utilizados para el chícharo sobre, proteína y energía corresponden a *L. vannamei* (Davis *et al.*, 2002), pero los utilizados para materia seca y AA corresponden a *Oncorhynchus mykiss* (Thiessen *et al.*, 2003).

5.3 Fabricación y Formulación de Dietas

En el presente trabajo todas las dietas se formularon con ayuda del programa Nutrion®, con el mismo lote de ingredientes y fueron fabricadas en el laboratorio; excepto por las dietas del experimento 1, que fueron producidas en la planta de alimentos Costamar por peletizado y pos-acondicionamiento utilizando los ingredientes de la compañía.

5.3.1 Dietas del efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente (Experimento 1)

En el experimento 1 se evaluaron tres dietas fabricadas de manera comercial (Alimentos Costamar, Sonora, México). Dos dietas a base de soya y deficientes en Met (0.6% de Met dietaria), de las cuales una fue suplementada con 0.14% MHA-Ca (0.12% de Met dietaria) en sustitución de pasta de soya para cubrir las recomendaciones para la industria (0.72% de Met dietaria) (Akiyama *et al.*, 1991) en alimentos con 30% de PC. Adicionalmente se evaluó una dieta control externo comercial. Las fórmulas correspondientes al presente experimento se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 4. Composición de las dietas del experimento 1 producidas mediante peletizado por Costamar y su contenido de Met.

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente Soya1	0.14% MHA	Control Externo
Hidroxi análogo de metionina-calcio	-	1.4	0.1
Pasta de soya	458.3	456.9	417.8
Harina de pescado	100.0	100.0	130.0
Harina de trigo	200.0	200.0	200.0
Trigo	65.0	65.0	77.0
Harina de crustáceo	20.0	20.0	-
Levadura	20.0	20.0	30.0
Harina de Kelp	20.0	20.0	30.0
Lecitina de soya	41.0	41.0	40.0
Aceite de pescado	30.0	30.0	30.0
Alimento procesado	40.0	40.0	40.0
Premezcla de vitaminas	3.7	3.7	3.1
Premezcla de minerales	1.5	1.5	1.5
Inhibidor de hongos	0.3	0.3	0.3
Antioxidante (ETQ)	0.2	0.2	0.2
Met total	6	7.2	7.2

Las fuentes de los ingredientes no se mencionan porque fueron producidas en Alimentos Costamar, aunque se trata de proveedores comerciales.

5.3.2 Dietas del efecto de hidroxi análogo de Met-Ca en un alimento experimental

deficiente (Experimento 2)

En el experimento 2 se evaluaron dos dietas fabricadas en laboratorio (experimentales), deficientes en Met. Una de ellas fue suplementada con 0.36% MHA-Ca (2.8% Met dietaria) en sustitución del trigo para cubrir las recomendaciones para la industria (Akiyama *et al.*, 1991) en alimentos con 30% de PC. La formulación y los ingredientes empleados en el presente experimento se presentan en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5. Formulación de las dietas del experimento 2 y su contenido de Met.

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente Soya2	0.36% MHA
Hidroxi análogo de metionina-calcio *	-	3.6
Harina de trigo (hard red Winter, Manitoba) †	487.6	484.0
Pasta de soya ‡	300.0	300.0
Aislado de soya (Prolise isolate 5001) §	94.9	94.9
Lecitina de soya •	41.0	41.0
Aceite de soya •	26.9	26.9
Oxido de Cromo (99%) ♂	10.0	10.0
Fosfato monocalcio ¶	10.0	10.0
Aqua savor **	10.0	10.0
Gluten de trigo ††	10.0	10.0
Colesterol (Solvay) ‡‡	3.1	3.1
Premezcla de vitaminas §§	2.5	2.5
Premezcla de minerales §§	2.5	2.5
Inhibidor de hongos §§	0.5	0.5
Antioxidante (ETQ) §§	0.5	0.5
Vitamina C Basf 35% §§	0.5	0.5
Met total	4.4	7.2

*Novus International (MO, USA);

†Altex S.A. de C.V., Molino San Cristóbal (México);

‡Proteínas Naturales S.A. de C.V. (México);

§Cargill Incorporated, Técnicas nutricionales S.A. (México);

•Ragasa Industrias S.A. de C.V. (Monterrey, México);

♂ Impex Continental (San Nicolás de los Garza, México);

¶ Tessengerlo Kerley Inc. (Novojoa, México);

** Bentoli AgriNutrition Inc. (México);

†† Grain products Inc. (México);

‡‡ Solvay pharmaceuticals (Houston, TX, USA);

§§ Alimentos Costamar (Sonora México). Las premezclas de vitaminas y minerales se conservaron a lo largo de todo la tesis. Premezcla de vitaminas: retinol 4000 UI/g, tiamina 24g/Kg, riboflavina 16g/Kg, DL pantotenato de calcio 30g/Kg, piridoxina 30g/Kg, cianocobalamina 80mg/Kg, ac. ascórbico 60g/Kg, menadion 16g/Kg, colecalciferol 3200UI/g, tocoferol 60g/Kg, biotina 400mg/Kg, niacina 20mg/Kg, ac fólico 4g/Kg. Premezcla de minerales: Co 2 g/Kg, Mn 16 g/Kg, Zn 40 g/Kg, Cu 20 g/Kg, Fe 1 g/Kg, Se 100 mg/Kg, I 2g/Kg.

Una vez obtenida la formulación, los ingredientes se molieron finamente en un molino (Cyclotec sample mil 1096, Tecator) a un número de malla 50 (300µm). Los macro ingredientes (más de 30g) se pesaron y mezclaron por 10 minutos a velocidad 1.5 en una batidora convencional (kitchen Aid Classic) para 1Kg de dieta. Por separado se pesaron y mezclaron en un contenedor los micro ingredientes (menos de 30 g, además de los AA suplementados) por 5 min con una espátula. En un recipiente de mezcladora se

colocaron los micro ingredientes, utilizando un poco de mezcla de macro ingredientes para limpiar el envase anterior, posteriormente se añadió el resto de mezcla de macro ingredientes y se mezcló por 10 minutos más. Se añadieron lentamente las grasas (previamente mezcladas en baño maría) y se mezclaron 10 minutos a velocidad 2. Se añadió el agua (a 40°C) partiendo de 100mL, y adicionando en función de la textura de la mezcla aproximadamente mientras se mezclaban todos los ingredientes por 15 minutos. La masa fue extruida en un molino cárnico (Tor-rey, modelo 22) por aproximadamente 30 minutos con una temperatura de alrededor de (70-90°C) en la salida del dado (1.6mm de luz). Las dietas se llevaron a una estufa de convección (Shel lab 1330 fx, Sheldon Manufacturing Inc.) por 8 minutos a una temperatura de 100°C. Finalmente se secaron al ambiente por 2 días para ser almacenadas en un refrigerador a 4°C.

5.3.3 Dietas del efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)

En el experimento 3 se evaluaron cuatro dietas experimentales a base de harina de trigo Manitoba y pasta de soya. Se evaluó una tercer dieta deficiente en Met (0.42% Met dietaria) a base de soya y trigo, además de tres dietas suplementadas con 0.4% DL-Met encapsulada en agar-agar (en reemplazo de almidón de trigo) con la finalidad de exceder las recomendaciones para la industria (Akiyama *et al.*, 1991). Dos de estas últimas dietas presentaron una relación 1:1 de DL-Met: agar, la tercera dieta mostró una relación 2:1 de DL-Met: agar. Todas las dietas fueron fabricadas usando el método ya descrito, sin embargo la mezcla de una de las dietas con Met encapsulada en agar con relación 1:1 fue empacada al vacío con plástico y pre-acondicionada en agua hirviendo a 90C durante un periodo de 5 minutos antes de ser extruida. La formulación y los ingredientes empleados en el presente experimento se presentan en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Formulación de las dietas del experimento 3 y su contenido teórico de Met (base húmeda).

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente Soya ³	Encapsulado Met1 sin preacondicionar	Encapsulado Met1 preacondicionado	Encapsulado Met2
DL-Met-Agar ^{*,†}	-	8.0	8.0	5.8
Harina de trigo Manitoba [‡]	424.6	424.6	424.6	424.6
Pasta de soya [§]	400.0	400.0	400.0	400.0
Aislado de soya (Prolise isolate 5001) [•]	48.4	48.4	48.4	48.4
Aceite de pescado [⌘]	45.0	45.0	45.0	45.0
Lecitina de soya [¶]	22.0	22.0	22.0	22.0
Fosfato monocalcio ^{**}	20.0	20.0	20.0	20.0
Almidón de trigo ^{††}	10.0	2.0	2.0	4.2
Aqua sabor ^{‡‡}	10.0	10.0	10.0	10.0
Gluten trigo ^{§§}	10.0	10.0	10.0	10.0
Premezcla de vitaminas [⌘]	2.5	2.5	2.5	2.5
Premezcla de minerales [⌘]	2.5	2.5	2.5	2.5
Colesterol (Solvay) ^{••}	3.2	3.2	3.2	3.2
Inhibidor de hongos [⌘]	0.5	0.5	0.5	0.5
Antioxidante (ETQ) [⌘]	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamina E [⌘]	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamina C Basf 35% [⌘]	0.3	0.3	0.3	0.3
Met (base húmeda)	4	8.2	8.2	8.2

* Evonik Degussa GmbH (Rodenbacher Chaussee, Hanau-Wolfgang);

† Dibico S.A. de C.V. (D.F., México);

‡ Molino Sant Joan S.A. de C.V. (Monterrey, México);

§ Proteínas Naturales S.A. de C.V. (México);

• Cargill Incorporated, Técnicas nutricionales S.A. (México);

⌘ Alimentos Costamar (Sonora México);

¶ Ragasa Industrias S.A. de C.V. (Monterrey, México);

** Tessengerlo Kerley Inc. (Novojoa, México);

†† Almidones y gluten S.A. (D.F., México);

‡‡ Bentoli AgriNutrition Inc. (México);

§§ Grain products Inc. (México);

•• Solvay pharmaceuticals (Houston, TX, USA).

5.3.4 Dietas del experimento 4

Al finalizar la evaluación del experimento 3 se decidió utilizar el perfil de AA del carcas del camarón como patrón de referencia en la formulación de dietas para el estudio de los requerimientos dietarios de los AAI, en lugar de las recomendaciones de Akiyama. En el experimento 4 para determinar el perfil del carcas del camarón se engordaron 4 grupos de camarones bajo cuatro diferentes condiciones de cultivo. El primer grupo se

alimentó con una dieta experimental (31% de PC, 8% de lípidos, 8.86% de cenizas, 7.4% humedad 43.27% de extracto libre de nitrógeno y fibra). El grupo 2 se alimentó con una dieta comercial de Agribrands-Purina (México) (32.4% de PC, 10.9% de lípidos, 8.3% de cenizas and 8.7% humedad). El grupo 3 y 4 se alimentaron con una dieta comercial de Alimentos Costamar (32% de PC y 9% de lípidos) y una dieta reforzada en proteína (37% de PC y 9% de lípidos).

5.3.5 Dietas del efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)

En el experimento 5 se evaluaron 6 dietas, 5 experimentales y una comercial. La primera formulada deficiente en Met y Lys (0.42% de Met y 1.7% Lys en la dieta) con respecto al perfil del carcas de camarón, las 4 dietas experimentales restantes fueron suplementadas a un nivel de 0.8% de Met dietaria con Met encapsulada en agar como se describió anteriormente y el AA entró en reemplazo de agar en la fórmula. De estas cuatro dietas tres fueron adicionadas con niveles de 0.45, 0.90 y 1.35% de Lys dietaria encapsulada en agar. La dieta comercial fungió de control externo. La fabricación de las dietas se realizó con el método inicialmente descrito. La formulación y los ingredientes empleados en el presente experimento se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Formulación de las dietas del experimento 5 y su contenido de Met y Lys (base húmeda).

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente		0.82%	0.82%	0.82%
	Met-Lys (soya 4)	Deficiente Lys	Met- 2.10%Lys	Met- 25.5%Lys	Met- 30.5%Lys
Fuente de Lys (LysHCl: agar) *, †	-	-	11.4	22.8	34.3
Fuente de Met (DL-Met: agar) ‡, †	-	8.0	8.0	8.0	8.0
Agar-Agar †	44.5	36.5	25.1	13.7	2.2
Pasta de soya §	400.0	400.0	400.0	400.0	400.0
Harina de trigo Manitoba •	362.6	362.6	362.6	362.6	362.6
Aislado de soya (Prolise isolate 5001) ♂	73.8	73.8	73.8	73.8	73.8
Aceite de pescado ¶	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
Lecitina de soya **	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Fosfato monocalcio ††	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3
Aqua savor ‡‡	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Gluten trigo §§	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Premezcla de vitaminas ¶¶	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Premezcla de minerales ¶¶	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Colesterol (Solvay) ••	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Inhibidor de hongos ¶¶	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antioxidante (ETQ) ¶¶	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamina E ¶¶	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamina C Basf 35% ¶¶	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Met teórica	4.2	8.1	8.1	8.1	8.1
Lys teórica	17.0	17.0	21.5	26.0	31.5

* Archer Daniels Midland Company (Decatur, IL, USA);

† Dibico S.A. de C.V. (D.F., México);

‡ Evonik Degussa GmbH (Rodenbacher Chaussee, Hanau-Wolfgang);

§ Proteínas Naturales S.A. de C.V. (México);

• Molino Sant Joan S.A. de C.V. (Monterrey, México);

♂ Cargill Incorporated, Técnicas nutricionales S.A. (México);

¶ Alimentos Costamar (Sonora México);

** Ragasa Industrias S.A. de C.V. (Monterrey, México);

†† Tessengerlo Kerley Inc. (Novojoa, México);

‡‡ Bentoli AgriNutrition Inc. (México);

§§ Grain products Inc. (México);

•• Solvay pharmaceuticals (Houston, TX, USA).

5.3.6 Dietas del efecto de Sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6)

En función de las evaluaciones realizadas en el experimento 5 (con adición de Met y Lys encapsuladas a dieta a base de Soya/trigo) y del perfil de carcas de camarón utilizado como restricción, se decidió regresar a una formulación usada en un experimento para evaluar productos de la compañía Degussa, a base de pasta de soya, harina de trigo, harina de chícharo amarillo del Canadá, harina de lupino y harina de kelp; deficiente en Met (0.39% de Met dietaría) y no en Lys (2.24%) y con mejor estabilidad en el agua de acuerdo al reporte técnico (Cruz-Suarez *et al.*, 2006). Sin embargo, la dificultad para obtener muestras de lupino dio origen a una segunda fórmula a base de chícharo amarillo (0.40% de Met y 2.1% de Lys), que a su vez dio origen a una tercer fórmula por la dificultad de obtener chícharo amarillo del Canadá que se sustituyó por chícharo verde (disponible en el mercado de la Merced, México DF) considerando la similitud en la composición de estas variedades reportada por Hickling (2003). En consecuencia en el experimento 6 se evaluaron la absorción de agua y la PMS de éstas 3 dietas para ver el impacto de los cambios en la formulación en estos parámetros. Así mismo se retomó el alimento utilizado en Degussa para evaluar su estabilidad en conjunto con las nuevas dietas, aplicando el método nuevo reportado en la metodología del experimento anterior. Las dietas se fabricaron por el método descrito en un inicio, sin embargo, con la inclusión de chícharo el agua se adicionó a temperatura ambiente, proceso que fue aplicado en los siguientes experimentos. La formulación y los ingredientes empleados en el presente experimento se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Formulación de las dietas del experimento 6 y su contenido teórico de Met y Lys (base húmeda).

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente Chícharo amarillo del Canadá 1 ¹	Deficiente Chícharo Amarillo del Canadá 2	Deficiente Chícharo verde del Canadá 1
Harina de chícharo entero amarillo *		490.0	-
Harina de chícharo entero verde†		-	360.0
Pasta de soya ‡		200.0	316.9
Aislado de soya (Prolise isolate 5001) §		138.2	80.0
Harina de trigo Manitoba •		-	100.0
Lecitina de soya ☒		69.3	31.5
Aceite de pescado ¶		14.0	41.4
Acido algínico (alta viscosidad) **		25.0	25.0
Harina de Kelp ¶		20.0	-
Harina de pescado prime ¶		15.0	5.0
Gluten de trigo ††		-	10.0
Carboximetil celulosa (CMC 50000) ‡‡		10.0	-
Fosfato monocalcio §§		-	10
CaCl ₂ **		10.0	7
Oxido de Cromo (99%) ••		-	7
Premezcla de vitaminas ¶		3.0	2.5
Colesterol (Solvay) ☒☒		2.8	1
Premezcla de minerales ¶		1.5	2
Vitamina C Basf 35% ¶		0.5	-
Inhibidor de hongos ¶		0.3	0.3
Vitamina E ¶		0.2	0.2
Antioxidante (ETQ) ¶		0.2	0.2
Met	3.9	4.0	4.0
Lys	22.4	21.2	20.7

* Cruz-Suarez *et al.*, 2001;

† Alta Calidad de Semillas y Granos S.A de C.V. (D.F., México);

‡ Proteínas Naturales S.A. de C.V. (México);

§ Cargill Incorporated, Técnicas nutricionales S.A. (México);

• Molino Sant Joan S.A. de C.V. (Monterrey, México);

☒ Ragasa Industrias S.A. de C.V. (Monterrey, México);

¶ Alimentos Costamar (Sonora México);

** Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA);

†† Grain products Inc. (México);

‡‡ Grupo Dermet de México S.A. DE C.V. (D.F., México);

§§ Tesserlo Kerley Inc. (Novojoa, México);

•• Impex Continental (San Nicolás de los Garza, México);

☒☒ Solvay pharmaceuticals (Houston, TX, USA);

¹Fórmula utilizada para evaluar los productos de Degussa en 2006.

5.3.7 Dietas de los experimentos 7 y 8

En los experimentos 7 y 8 la fórmula a base de chícharo verde 1 fue ligeramente modificada con la finalidad de disminuir el contenido de lípidos (de 10 a 9%), de manera que la pasta de soya subió mientras que el aceite de pescado, la lecitina de soya y el colesterol disminuyeron para dar lugar a nueva fórmula deficiente en Met a base chícharo verde del Canadá 2. En el experimento 7 además se emplearon 4 dietas experimentales suplementadas con 0.05, 0.10, 0.20 y 0.40% de DL-Met libre en reemplazo de harina de trigo y una dieta comercial como control positivo. En el experimento 8 se utilizaron las dietas suplementadas con 0.20 y 0.40% así como una con 0.80% de DL-Met. Las dietas se fabricaron de igual manera que en el experimento anterior. La formulación y los ingredientes empleados se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Formulación de las dietas del experimento 7 y 8, así como su contenido teórico de Met (base húmeda).

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente Chícharo verde del Canadá 2	Experimento 7		Experimento 8		
		0.05%	0.10%	DL-Met		
		0.20%	0.40%	0.80%		
Fuente de Met (DL-Met) *	-	0.50	1.00	2.00	4.00	8.0
Harina de chícharo entero †	360.0	360.0	360.0	360.0	360.0	360.0
Pasta de soya ‡	317.8	317.8	317.8	317.8	317.8	317.8
Harina de trigo Manitoba §	100.0	99.5	99.0	98.0	96.0	92.0
Aislado de soya (Prolyse isolate 5001) •	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
Aceite de pescado ☒	41.0	41.0	41.0	41.0	41.0	41.0
Lecitina de soya ¶	31.0	31.0	31.0	31.0	31.0	31.0
Acido algínico (alta viscosidad) **	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Fosfato monocalcio ††	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Gluten de trigo ‡‡	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
CaCl ₂ **	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Oxido de Cromo (99%)§§	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Harina de pescado prime ☒	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Premezcla de vitaminas ☒	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Premezcla de minerales ☒	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Colesterol (Solvay) ••	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Inhibidor de hongos ☒	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamina E ☒	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Antioxidante (ETQ) ☒	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Met (base húmeda)	4.0	4.5	5.0	6.0	8.0	12.0

* Evonik Degussa GmbH (Rodenbacher Chaussee, Hanau-Wolfgang);

† Alta calidad de semillas y Granos S.A de C.V. (D.F., México);

‡ Proteínas Naturales S.A. de C.V. (México);

§ Molino Sant Joan S.A. de C.V. (Monterrey, México);

• Cargill Incorporated, Técnicas nutricionales S.A. (México);

☒ Alimentos Costamar (Sonora México);

¶ Ragasa Industrias S.A. de C.V. (Monterrey, México);

** Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA);

†† Tessengerlo Kerley Inc. (Novojoa, México);

‡‡ Grain products Inc. (México);

§§ Impex Continental (San Nicolás de los Garza, México);

•• Solvay pharmaceuticals (Houston, TX, USA).

5.3.8 Dietas del efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)

En el experimento 9 a partir de la fórmula a base de chícharo verde 1 ya descrita para el experimento 6, se fabricaron 2 alimentos; uno con el procedimiento anteriormente empleado y otro en el cual, después de la extrusión y antes de secar en la estufa de convección, los fideos fueron post acondicionados a 18.5Psi (125C) x 5 minutos en una olla de presión.

5.3.9 Dietas del efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de *L. vannamei* (Experimento 10)

En el experimento 10 se evaluaron dos dietas fabricadas de igual manera a las antes descritas en el experimento 9, además de otras dos agregando a la mezcla 0.4% de DL-Met libre como aditivo; de estas últimas los fideos de una, antes de ser pos-acondicionadas se esprearon con 30mL de una solución de Aqua-sabor al 10% (P/V).

5.3.10 Dietas de contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de *L. vannamei*

(Experimento 11)

En el experimento 11 para poder distinguir la incorporación de nitrógeno dietario del chícharo canadiense o la harina de pescado se consideró del empleo de dietas isoproteicas. El contenido de proteína cruda (PC) en la harina de chícharo utilizada en este trabajo fue de 24.4%; por otro lado el contenido de la harina de pescado fue de 69.4% (Maricultura-Mawhiney). Esta diferencia llevó a formular una dieta con chícharo como única fuente de proteína al máximo contenido posible, que fue de 21.38%. Se tomó la dieta anterior como base para formular una dieta con un nivel similar de proteína usando únicamente harina de pescado, resultando en 23.06%PC. Ya obtenidas las fórmulas de referencia (chícharo y pescado), se formularon 5 dietas, donde se reemplazó la fórmula a base de chícharo por 5, 15, 30, 45 y 60% de la fórmula a base de pescado.

El método usado a en la fabricación de las dietas fue semejante al del experimento anterior, salvo que se midió el pH a la mezcla antes de incluir el agua y se ajustó a pH 8 usando NaOH 1M como lo reportado por Lim (1993); se adicionaron 70mL y 30mL a las dietas de referencia de chícharo y de pescado, así como las cantidades correspondientes a las proporciones en cada dieta. El agua en las dietas del experimento 11 fue añadida gradualmente hasta formar una masa plástica, la que fue extruida a temperatura ambiente (24C) en un aditamento de molido para la mezcladora, con un dado de 1.4mm de luz. Una vez obtenidos los fideos el proceso siguió como en el experimento anterior. La formulación y los ingredientes empleados en el presente experimento se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Formulación de las dietas del experimento 11.

Ingrediente (g/Kg dieta)	Deficiente	95%	85%	70%	55%	40%	100% proteína de pescado
	Chícharo verde del Canadá 3	PCh: 100% PP	PCh: 15% PP	PCh: 30% PP	PCh: 45% PP	PCh: 60% PP	
Harina de pescado prime *	-	16.2	48.5	96.9	145.4	193.9	323.2
Harina de chícharo verde entero †	849.2	806.6	721.7	594.5	467.0	339.7	-
Almidón de trigo ‡	-	22.5	67.4	134.9	202.3	269.7	449.5
α -celulosa §	-	4.5	13.5	27.0	40.5	54.0	90.0
Aceite de pescado *	47.7	47.6	47.5	47.2	47.0	46.7	46.0
Lecitina de soya •	33.7	33.3	32.5	31.2	30.0	28.8	25.5
Acido algínico (alta viscosidad) §	15.0	15.5	16.5	18.0	19.5	21.0	25.0
Fosfato monocalcio ☒	29.2	28.7	27.6	26.0	24.4	22.8	18.6
Aqua savor ¶	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
CaCl ₂ §	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Colesterol (Solvay) **	3.0	2.9	2.6	2.1	1.7	1.2	0.0
Premezcla de vitaminas *	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Premezcla de minerales *	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Inhibidor de hongos *	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Antioxidante (ETQ) *	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E *	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

* Alimentos Costamar (Sonora México);

† Alta Calidad de Semillas y Granos S.A de C.V. (D.F., México);

‡ Almidones y Gluten S.A. (D.F., México);

§ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA);

• Ragasa Industrias S.A. de C.V. (Monterrey, México);

☒ Tessenderlo Kerley Inc. (Novojoa, México);

¶ Bentoli AgriNutrition Inc. (México);

** Solvay Pharmaceuticals (Houston, TX, USA).

5.4 Análisis Químicos

Las composiciones proximales correspondientes a los ingredientes, los alimentos (previa molienda a 300 μ m en un molino Cyclotec 1096, Tecator), los alimentos lixiviados (previa molienda con mortero) y los camarones (previa liofilización y molienda con licuadora) para cada experimento se determinaron en el laboratorio del Programa Maricultura, UANL, mediante los siguientes métodos. Proteína cruda por el método Dumas (truspec CHN modelo 630-100-300, LECO) 990.03 AOAC (1997); lípidos por el método Tecator 1983 (Sistema Soxhlet HT-1045); humedad, ceniza y fibra

por los métodos 930.15, 942.05 y 962.09 AOAC (1997) y el extracto libre de nitrógeno es calculado por diferencia. La energía bruta fue determinada en una bomba semicalorimétrica (Parr 1425, Equipar S.A. de C.V. México, D.F.). El óxido de cromo en las dietas, como en las heces para el experimento 6 fue analizado mediante el método de Bolin (1952) modificado por Nieto (2003).

En los experimentos 1 y 2, el perfil de AA se determinó de acuerdo con la metodología del Programa Maricultura, UANL (Guajardo, 2000), mientras el contenido de MHA o HMTBa fueron realizados por la empresa Novus International, en un laboratorio externo. En los experimentos 4, 5, 7 y 8 los AA de los camarones y los alimentos antes y después de lixiviar fueron analizados por el laboratorio analítico comercial de Evonik Degussa GmbH Health & Nutrition, Animal Nutrition Services (Hanau, Alemania) usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las muestras se prepararon mediante una hidrólisis ácida para la mayor parte de los AA. Para los AA azufrados se utilizó una oxidación con ácido perbromico seguido de una hidrólisis ácida de metasulfito de sodio método 994.12, alternativas III y I, respectivamente, (Llames and Fontaine, 1994; AOAC International, 1997; Fontaine, 2003). El Trp y la Tyr no fueron analizados. En el experimento 11 los AA fueron analizados por el Laboratorio analítico de la Universidad de Missouri “Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories” usando HPLC de intercambio de cationes acoplado a una postcolumna de ninhydrina, método 982.30 E (a, b, c) (AOAC International, 2006)

En el experimento 11 los isótopos estables de los ingredientes, las dietas y el músculo de camarón se analizaron en las instalaciones de isotopos estables del Departamento de Ciencias de las Plantas, Universidad de California (Davis, CA, USA). Se usó un analizador elemental PDZ Europa Scientific Roboprep acoplado a un espectrómetro de masas para proporciones isotópicas PDZ Europa Hydra 20/20 (Crewe, UK). Las muestras no fueron pre tratadas para extraer lípidos.

5.5 Análisis Físicos

Para determinar la pérdida de materia seca (PMS), pérdida de energía (PE), pérdida de proteína cruda (PPC) y pérdida de cada aminoácido (PAA) de los alimentos lixiviados en los experimentos 1, 3 y 5 se siguió la metodología tradicional (MT) usada en el programa Maricultura (Ricque *et al.*, 2006 modificada). A partir del experimento 5 los alimentos fueron evaluados por un método nuevo (MN). Ambos métodos se describen a continuación. Simultáneamente se tomaron series completas de los tratamientos, debido a la variación entre lixivaciones consecutivas. Las muestras de dietas lixivadas que se analizaron estaban constituidas de un pool de replicados.

El MT consiste en cribar y pesar en 3g de pelets en un tamiz de lixiviación de pvc y fondo de malla #40 llevado a peso constante. Un bote plástico PET de lixiviación de 250 mL se llena con 200mL de agua marina reconstituida (Fritz Industries Inc, Dallas, Texas, U.S.A). El tamiz se coloca en el bote y este a su vez se coloca en un agitador (Shak-R-bath, Lab line, U.S.A.) con baño de agua (30 rpm y 27-29°C) por un tiempo estipulado de inmersión. Se retira el tamiz y se recuesta a 45° sobre la boca del bote plástico por 15 minutos. Se pasa a una toalla absorbente por 30 segundos para retirar el exceso de agua y se pesa para obtener la absorción de agua. Se lleva a la estufa por 4 hrs, se enfría y se obtiene el peso final, a partir del cual se obtiene la PMS. Con base en la absorción de agua se contempló una corrección por sales depositadas en el pelet después del secado en la estufa (comunicación personal con Guajardo, 2007). En el caso particular del experimento 2 se empleó el método descrito por Ricque *et al.* (2006) y sin corregir por sal.

El MN consiste en cribar y pesar 3g de pelet en un bote plástico de lixiviación de 250 mL, se adiciona 200mL de agua marina reconstituida, e inmediatamente se coloca en un agitador con baño de agua (30 rpm, 27-29°C) por el tiempo estipulado (60 minutos). Se filtra el contenido del bote en una malla #40 de acero inoxidable. Las mallas con el alimento se secan sobre una toalla 15 minutos y luego se pesan para obtener la absorción de agua. Después se llevan a la estufa por 2 horas. Las mallas se pesan y se obtiene la PMS.

Se utilizaron las ecuaciones siguientes: % PMS = $100 \cdot (DWd - DWwid) / DWd$; % Abs = $100 \cdot (WWwid - WWd) / WWd$; la corrección por sales depositadas en el peso final de la materia seca DWwid corregido = $DWwid - ((WWwid - WWd) \cdot 0.033 \text{ (g sal/g agua)})$; % PE = $100 \cdot (Ed - Ewid \cdot (1 - PMS/100)) / Ed$; % PPC = $100 \cdot (CPd - CPwid \cdot (1 - PMS/100)) / CPd$; % PAA = $100 \cdot (AAd - AAwid \cdot (1 - PMS/100)) / AAd$.

Donde DWd es el peso seco (DW) de la dieta, DWwid el peso seco de la dieta después de ser inmersa, WWd es el peso húmedo de la dieta, WWwid es el peso húmedo de la dieta después ser inmersa, Ed es el contenido de energía en la dieta, Ewid es el contenido de energía en la dieta después de ser inmersa, donde CPd es el % de proteína en la dieta (base seca), CPwid es el % de proteína en la dieta después de ser inmersa, AAd es el % de AA en la dieta y AAwid es el % de proteína en la dieta después de ser inmersa.

5.6 Animales de Experimentación

5.6.1 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente

(Experimento 1)

Los camarones utilizados en el experimento 1 fueron obtenidos del laboratorio de Maricultura del Pacífico S.A. (Mazatlán, Sinaloa, México). Se recibieron el día 6 de Agosto de 2007, con una talla entre 0.10 y 1.80g. Los camarones tomados para el bioensayo fueron de un peso promedio de $0.77g \pm 0.02$.

5.6.2 Efecto de hidroxí análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente

(Experimento 2)

Los camarones utilizados en el experimento 2 fueron obtenidos del laboratorio de Maricultura del Pacífico S.A. (Mazatlán, Sinaloa, México). El peso promedio inicial de los camarones seleccionados para el bioensayo fue de $0.39\text{g} \pm 0.00$.

5.6.3 Perfil de AA de carcas de *L. vannamei* como patrón de referencia (Experimento 4)

Los camarones utilizados en el experimento 4 fueron engordados bajo cuatro diferentes condiciones de cultivo, apropiadas para la especie: El primer grupo de juveniles fue obtenido de Industrias Pecis S.A. de C.V. (Yucatán, México) con un peso inicial de 0.460g y engordado hasta los $3.20 \pm 0.320\text{g}$ en el Programa Maricultura, el segundo, tercer y cuarto grupo de juveniles fueron obtenidos del laboratorio de Maricultura del Pacífico S.A. (Mazatlán, Sinaloa, México); el segundo grupo tuvo un peso inicial de $0.33 \pm 0.00\text{g}$ y engordados hasta $1.23 \pm 0.14\text{g}$ en el Programa Maricultura, el tercer y cuarto grupo fueron engordados en granja San Esteban, Sonora; comenzaron a ser monitoreados con un peso inicial de $1.67 \pm 0.70\text{g}$ (9 de Mayo de 2008) los camarones del tercer grupo fueron colectados a los 17, 28, 41, 51 y 81 días (26 de Mayo, 6 de junio, 19 de junio, 29 Junio y 29 de Julio, 2008) con un peso de $4.13 \pm 1.06\text{g}$, $4.92 \pm 2.27\text{g}$, $6.05 \pm 1.78\text{g}$, $9.37 \pm 1.4\text{g}$ y $16.67 \pm 2.66\text{g}$ respectivamente. El cuarto grupo de camarones fue colectado a los 17, 51 y 81 días (26 de Mayo, 29 Junio y 29 de Julio) con pesos de $4.12 \pm 1.12\text{g}$, $9.24 \pm 2.58\text{g}$ y $14.70 \pm 1.94\text{g}$.

5.6.4 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)

Los juveniles utilizados en el experimento 5 fueron obtenidos del laboratorio de Maricultura del Pacífico S.A. (Mazatlán, Sinaloa, México). Se recibieron el 17 de Septiembre de 2010 y se aclimataron en 2 tanques de 500L de fibra de vidrio por un periodo de 7 días con 2 alimentos comerciales; por la mañana se alimentó con Malta Clayton (12% de humedad, 40% de PC, 8% de Lípidos y 13% ceniza) y por la tarde se alimentó con Costamar (35% de PC). El peso promedio inicial de los camarones seleccionados para la engorda fue de 0.708 ± 0.033 g.

5.6.5 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios (Experimento 7)

Los juveniles utilizados en el experimento 7 fueron obtenidos del laboratorio de Maricultura del Pacífico S.A. (Mazatlán, Sinaloa, México). Se recibieron el día 26 de Marzo de 2009 a las 8:40 pm con una talla de 0.3-1g y con un 20% de mortalidad, la que se adjudicó a la alta densidad de animales en los paquetes enviados para animales de esa talla. Se alimentaron con una migaja grande de Malta Clayton (12% de humedad, 40% de PC y 8% de lípidos). El peso promedio inicial de los camarones seleccionados para la engorda fue de 0.60 ± 0.002 g.

5.6.6 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en jaulas (Experimento 8)

Los juveniles utilizados en el experimento 8 fueron obtenidos del lote descrito en el experimento anterior, pero con un peso promedio inicial fue de $0.97\pm 0.15\text{g}$.

5.6.7 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad (Experimento 9)

Los juveniles utilizados en el experimento 9 fueron obtenidos del laboratorio de Maricultura del Pacífico S.A. (Mazatlán, Sinaloa, México) y del Laboratorio de Acuacultura integral (Nayarit, México). Se recibieron el día 26 Junio de 2009 con pesos promedio de $0.63\pm 0.31\text{g}$ para los de Nayarit y $0.78\pm 0.23\text{g}$ para los de Sinaloa. El peso inicial promedio de los camarones seleccionados para obtener la digestibilidad de las dietas fue de $0.90\text{g}\pm 0.04\text{g}$.

5.6.8 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre la estabilidad de la dieta y rendimiento de *L. vannamei* (Experimento 10)

Los juveniles utilizados en el experimento 10 fueron obtenidos del laboratorio de Langostinos y Camarones de Oriente S. A. de C.V. (Veracruz, Veracruz, México). Se recibieron el día 15 de Marzo 2010 después de 24 hrs de traslado, con una talla promedio de 0.616g y con un 10% de mortalidad, la que se adjudicó al canibalismo por ausencia de alimento. Se alimentaron con un micropelet Costamar (12% de humedad, 40% de PC y 8% de lípidos). El peso inicial promedio de los camarones seleccionados para la engorda fue de $0.67\pm 0.002\text{g}$.

5.6.9 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de *L. vannamei*

(Experimento 11)

Los juveniles utilizados en el experimento 10 fueron obtenidos del laboratorio de Langostinos y Camarones de Oriente S. A. de C.V. (Veracruz, Veracruz, México). Se recibieron el día 21 de Junio de 2010 y fueron mantenidos en un periodo de aclimatación (20 días) a base de un micropellet Costamar (30% de PC) con valor isotópico $\delta^{15}\text{N}=10$. El peso inicial de los camarones seleccionados para la engorda fue de $0.140\pm 0.030\text{g}$.

5.7 Condiciones Experimentales

Los bioensayos de crecimiento y digestibilidad fueron realizados en las instalaciones del Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. La sala de bioensayos cuenta con un sistema de recirculación de agua marina diseñado para que las posibles variaciones en la calidad de agua afecten a todos los tanques simultáneamente. Los tanques utilizados están contruidos de fibra de vidrio, con un sistema de recirculación interna ("air lift") y 60L capacidad (60 X 30 X 35cm). La calidad de agua fue monitoreada cada día para salinidad y temperatura, mientras que cada semana se siguieron los valores de nitratos, nitritos, amonio total y pH. Durante los bioensayos se conservó un fotoperiodo de 12hrs continuas de luz. Los restos de alimento, las exuvias y los animales muertos se registraron y se removieron cada mañana durante el desarrollo del bioensayo. Durante los dos primeros días de cada bioensayo los camarones afectados por la manipulación y muertos, se reemplazaron por organismos de un peso semejante. Aunque en el caso del experimento 11 solo se reemplazaron animales muertos durante el primer día de bioensayo, debido a que el fraccionamiento isotópico se da en función de la dieta consumida.

Todos los bioensayos se desarrollaron en condiciones controladas de calidad de agua dentro de la sala de bioensayos del Programa Maricultura, con excepción del

experimento 4. En el experimento 4 los grupos 1 y 2 de juveniles fueron engordados en la sala de bioensayos, sin embargo los grupos 3 y 4 fueron cultivados en condiciones de granja (San Esteban, Hermosillo, México). Los parámetros de calidad de agua en los experimentos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros de calidad de agua en los experimentos de la tesis.

Experimento	Temperatura °C	Salinidad (g/L)	pH	Nitratos (g/L)	Nitritos (g/L)	Amonio total (g/L)
1	29.0 ±0.5	29.1±5.2	8.5±0.0	11.3±6.3	0.5±0.4	0.1±0.0
2	29.0 ±0.5	29.1±5.2	8.5±0.0	11.3±6.3	0.5±0.4	0.1±0.0
4						
Grupo1	30.2±0.5	26.8±1.6	8.1±0.0	43.3±25	ND	0.1±0.1
Grupo2	30.2±0.5	29.8 ±1.3	8.2±0.0	500±1	ND	0.5 ±0.0
Grupo3	-	-	-	-	-	-
Grupo4	-	-	-	-	-	-
5	30.0 ±1.4	29.3±2.2	7.9±0.15	73.3±43	0.25±0	ND
7	31.0±1.0	32.0±0.8	8.8±0.0	120.0±40	ND	ND
8	30.1±1.0	34.1±1.5	8.5±0.3	80.0±63	ND	ND
9	31.4±0.6	26.5±0.8	8.2±0.0	52.5 ±6.3	ND	ND
10	28.2±0.9	34.4±1.5	8.3±0.8	ND	ND	ND
11	29.9±0.7	33.4±0.7	8.4±0.1	10±0	ND	ND

Los parámetros analizados y con niveles no detectables de los compuestos se marcan con ND, mientras que los datos no analizados se marcan con un guión.

5.8 Diseño Experimental, variables evaluadas y análisis estadístico

En todos los experimentos se siguió un diseño por bloques al azar. Adicionalmente en cada uno de los bioensayos se realizó una distribución uniforme entre acuarios.

5.8.1 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente

(Experimento 1)

El diseño del experimento 1 consideró 3 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, 0.0% MHA, 0.14% MHA y Control comercial externo. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a los 60 minutos de inmersión. En el bioensayo de crecimiento con duración de 28 días se asignaron 4 acuarios (replicados) con 11 animales en cada uno. Los juveniles se alimentaron a saciedad, iniciando con 10% un porcentaje de la biomasa. La ración diaria fue entregada en dos alimentaciones a las 10:00 y a las 18:00 hrs, procurando un mínimo de 2 pelets por camarón.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, perfil de AA, ABS, PMS, PPC, PE, PMet, PMHA, PLys y PArg a 60 minutos de inmersión. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), supervivencia (Suv), biomasa, consumo individual (Cons), tasa de conversión alimenticia (TCA), Tasa de eficiencia proteica (TEP), Utilización neta de PC (UNP) y se calcularon mediante las siguientes ecuaciones: $\text{Peso} = \sum \text{pesos individuales (g)} / \text{número de individuos}$; $\% \text{ GP} = 100 \times [(\text{peso}_F - \text{peso}_I) / \text{peso}_I]$; $\text{TCE} = 100 \times \ln(\text{peso}_F / \text{peso}_I) / \text{días}$; $\% \text{ Suv} = 100 \times (\text{número}_F / \text{número}_I)$; $\text{biomasa} = \text{Peso (g/individuo)} \times \text{número}_F$; $\text{Cons} = \sum_{x=1}^F \text{alimento consumido (g)} / \text{número}_F$; $\text{TCA} = \text{consumo (g/individuo)} / (\text{peso}_F - \text{peso}_I)$; $\text{Tasa de eficiencia proteica (TEP)} = (\text{peso}_F - \text{peso}_I) / \text{Cons} \times \text{PC dietaria (g)}$; $\text{Utilización neta de PC (UNP)} = (\text{peso}_F \times \text{PC}_F \text{ de camarón} - \text{peso}_I \times \text{PC}_I \text{ de camarón}) / \text{Cons} \times \text{PC (g)}$. Donde I es el tiempo inicial, F es el tiempo final, PC es la concentración de PC expresada en g/100g del material (base húmeda).

Los resultados del bioensayo de crecimiento para el total de tratamientos (incluyendo el control positivo) se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una comparación de medias por el método Duncan. Los tratamientos con 0.0 y 0.14% de MHA se compararon estadísticamente mediante una prueba de T-student. Las

comparaciones anteriores se realizaron utilizando $P < 0.05$, mediante el uso del programa SPSS (v 17.0, SPSS Inc.).

5.8.2 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente

(Experimento 2)

El diseño del experimento 2 consideró 2 tratamientos correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, 0.0% MHA, 0.36% MHA. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a 60 minutos inmersión. En el bioensayo con duración de 35 días se asignaron 4 acuarios (replicados) con 12 animales en cada uno. Los juveniles se alimentaron a saciedad (iniciando con un 10% de la biomasa), después de 21 días sin notar diferencias en crecimiento, se alimentó a una tasa fija de 0.049g de alimento/camarón/día (0.0147 mg de PC/camarón/día o 0.0063mg de Met/camarón/día). La ración diaria fue entregada en dos alimentaciones a las 10:00 y a las 18:00 hrs, procurando un mínimo de 2 pelets por camarón.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, ABS y PMS. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, GP, TCE, Suv, biomasa, Cons, TCA, TEP y UNP. Los resultados de los análisis fisicoquímicos y del bioensayo de crecimiento de los tratamientos con 0.0 y 0.14% de MHA se compararon estadísticamente mediante una prueba de T-student ($P < 0.05$) con ayuda del programa SPSS.

5.8.3 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)

El diseño del experimento 3 consideró 4 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, deficiente a base de soya 3, encapsulado 1Met:1Agar sin precondicionar, encapsulado 1Met:1Agar precondicionado,

encapsulado 2Met:1Agar sin preacondicionar. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a 60 minutos de inmersión.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, ABS, PMS, Met en la dieta antes y después de lixiviar así como la Met en el agua de lixiviación. Los resultados de los análisis fisicoquímicos para el total de tratamientos se compararon mediante un ANOVA ($P < 0.05$), seguido de una comparación de medias por el método Duncan mediante el programa SPSS.

5.8.4 Perfil de AA de carcas de *L. vannamei* como patrón de referencia (Experimento 4)

El diseño del experimento 4 consideró analizar los perfiles de AA del carcas de camarón de 4 grupos de juveniles, engordados bajo diferentes condiciones de cultivo. El grupo 1 consistió de 4 muestras constituidas de la mezcla de 10 camarones ($3.2 \pm 0.32\text{g}$). El grupo 2 constó de 6 muestras compuestas de la mezcla de 40 camarones ($1.23 \pm 0.14\text{g}$). Las muestras de los grupos 3 y 4 consistieron de 200g de camarones (en peso vivo) en distintas fechas a lo largo de la engorda; cinco muestras para el grupo 3 y tres muestras para el grupo 4.

Las variables evaluadas fueron un perfil de AA (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, Ile, Leu, Val, His, Phe, Gly, Ser, Pro, Ala, Asp y Glu) y PC del carcas de camarón de los grupos de camarones liofilizados. El perfil de AA del carcas de camarón utilizado como patrón de referencia se comparó contra los perfiles de AA encontrados en bibliografía; las recomendaciones para la industria de Akiyama (1991), harinas de camarón, camarón entero, cola de camarón y cabeza de camarón. Se construyeron dos perfiles con base en los límites inferiores y superiores de los AA de las harinas de camarón, usando confianza de 95%. Las comparaciones entre perfiles se realizaron mediante un análisis de correlación empleando el programa Excel (Office 2007, Microsoft Co.)

5.8.5 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)

El diseño del experimento 5 consideró 6 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, Deficiente Met-Lys, Deficiente Lys, 0.82% Met-2.10% Lys, 0.82% Met-2.55% Lys y 0.82% Met-3.05% Lys y un control externo. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados, en 3 tiempos de inmersión, a los 15, 30 y 60 minutos. En el bioensayo con duración de 42 días se asignaron 4 acuarios (replicados) con 12 animales en cada uno. Los juveniles se alimentaron a saciedad (iniciando con un 10%). La ración diaria fue entregada en tres alimentaciones a las 10:00, 14:30 y 18:00 hrs, procurando un mínimo de 2 pelets por camarón.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, perfil de AA (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, Ile, Leu, Val, His, Phe, Gly, Ser, Pro, Ala, Asp y Glu), ABS, PMS, PPC, PMet, PLys, PArg y PCys. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, GP, TCE, Suv, biomasa, Cons, TCA, TEP y UNP, además de las utilización neta de Met (UNMet) y de Lys (UNLys), que se calcularon mediante las siguiente ecuación: utilización neta de AA (UNAA) = $(\text{peso}_F \text{ (g)} * \text{AA}_F \text{ en camarón} - \text{peso}_I \text{ (g)} * \text{AA}_I \text{ en camarón}) / \text{Cons} * \text{AA (g)}$. Donde I es el tiempo inicial, F es el tiempo final y AA es la concentración de AA expresada en g/100g del material (base húmeda).

Los resultados de los análisis fisicoquímicos y del bioensayo de crecimiento (para el total de tratamientos (incluyendo el control positivo) y para los tratamientos con niveles crecientes de Lys) se compararon mediante un ANOVA acompañado por una comparación múltiple de medias por el método de Duncan. Los dos métodos de lixiviación a los 60 minutos de inmersión y los resultados de zootecnia de las dietas sin y con Met encapsulada en agar se analizaron con pruebas de T-student. Para los análisis anteriores se usó una $P < 0.05$ y utilizó el programa SPSS. Además se desarrollaron correlaciones lineales de la proporción relativa de Lys/Met y los parámetros zootécnicos GP, Suv y UNMet, mediante un análisis de regresión utilizando el programa Excel.

5.8.6 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta (Experimento 6)

En el experimento 6 se realizaron 2 comparaciones de los análisis físicos de los alimentos durante 60 minutos de inmersión. En la primera se comparó la estabilidad de las dietas deficiente chícharo amarillo 1 vs. deficiente chícharo amarillo 2; donde se realizaron 9 replicados. En la segunda comparación, se comparó la dieta deficiente chícharo amarillo 2 vs. deficiente chícharo verde 1, empleando 5 replicados. Las variables evaluadas en los alimentos fueron ABS y PMS. Los resultados de los análisis fisicoquímicos para el total de tratamientos se compararon mediante un ANOVA ($P < 0.05$), seguido de una comparación de medias por el método Duncan mediante el programa SPSS.

5.8.7 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en acuarios (Experimento 7)

El diseño del experimento 7 consideró 6 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, deficiente chícharo verde², 0.05% de DL-Met, 0.10% de DL-Met, 0.20% de DL-Met, 0.40% de DL-Met y Control positivo. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión. En el bioensayo de crecimiento con duración de 15 días se asignaron 4 acuarios (replicados) con 10 animales en cada uno. Los juveniles se alimentaron a saciedad, iniciando con 10% de la biomasa. La ración diaria fue entregada en tres alimentaciones a las 10:00, 14:30 y 18:00 hrs, procurando un mínimo de 2 pelets por camarón.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, perfil de AA (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, Ile, Leu, Val, His, Phe, Gly, Ser, Pro, Ala, Asp y Glu), ABS,

PMS, PPC y PAA. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, GP, TCE, Suv, biomasa, Cons, TCA, TEP. Los resultados de los análisis fisicoquímicos y de los bioensayos de crecimiento para el total de tratamientos y excluyendo al control positivo se compararon mediante un ANOVA, seguido de una comparación de medias por el método Duncan. Los análisis anteriores se realizaron utilizando una $P < 0.05$ y empleando el programa SPSS.

5.8.8 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya evaluado en jaulas (Experimento 8)

El diseño del experimento 8 consideró 5 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, deficiente chícharo verde², 0.20% de DL-Met, 0.40% de DL-Met, 0.80% de DL-Met y Control positivo. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión. En el bioensayo de crecimiento con duración de 28 días se asignaron 5 acuarios (replicados) con 5 animales cada uno en jaulas individuales. Las jaulas fueron fabricadas de malla de polietileno de 5x5mm y luz de 3x3mm, con un tamaño de 5cm de radio x 27 de altura. Los juveniles se alimentaron a saciedad, en un porcentaje de la biomasa, iniciando con 10%. La ración diaria fue entregada en 3 alimentaciones de cuando menos un pelet a las 10:00, 14:30 y 18:00 hrs.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, perfil de AA (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, Ile, Leu, Val, His, Phe, Gly, Ser, Pro, Ala, Asp y Glu) ABS, PMS, PPC y PAA. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, GP, TCE, Suv, biomasa, Cons, y TEP, además de la eficiencia alimenticia (EA) que se calculó mediante la siguiente ecuación: $EA = (\text{peso}_F - \text{peso}_I) (g) / \text{consumo} (g/\text{individuo})$. Donde I es el tiempo inicial y F es el tiempo final. Los resultados de los análisis fisicoquímicos y de los bioensayos de crecimiento para el total de tratamientos y excluyendo al control positivo se compararon mediante un ANOVA, seguido de una comparación de medias por el

método Duncan. Los análisis anteriores se realizaron utilizando una $P < 0.05$ y empleando el programa SPSS.

5.8.9 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad

(Experimento 9)

En el experimento 9 se empleó un diseño simple para evaluar los parámetros físicos de los alimentos, considerando como variable la fabricación, sin y con pos-acondicionamiento; se usaron 3 replicados a los 60 minutos de inmersión. En el bioensayo de digestibilidad se consideró un diseño de dos factores con dos variables; siendo el primer factor fabricación de la dieta (sin y con pos-acondicionamiento) y el segundo es el origen del camarón (Sinaloa o Nayarit). Se asignaron 3 acuarios a cada tratamiento con 10 animales en cada uno.

La colecta de heces se realizó de la siguiente manera. Se pesó el alimento, 10% de la biomasa del acuario un día antes. A la mañana siguiente se sifonearon los tanques, después se alimentó a intervalos de 30 segundos el 40% de la ración diaria. Se sifonearon las heces de los tanques dos horas después de la alimentación (primera colecta), las cuales fueron lavadas y puestas en congelación. Inmediatamente después de la primera colecta se repite la alimentación y colecta de heces en la misma forma. Al finalizar la segunda colecta se alimenta con el 20% restante de la ración y la colecta de heces se repite.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, ABS, PMS, PPC y PE. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMSD), de la PC (DAPD) y de la energía (DAED) que se calcularon mediante las ecuaciones siguientes (Maynard *et al.*, 1981): $\% \text{ DAPDA} = [1 - (\% \text{ CrD} / \% \text{ PD}) \times (\% \text{ PH} / \% \text{ CrH})] \times 100$; $\% \text{ DAMSD} = 100 - 100 (\% \text{ CrD} / \% \text{ CrH})$; $\% \text{ DAED} = [1 - (\% \text{ CrD} / \% \text{ ED}) \times (\% \text{ EH} / \% \text{ CrH})] \times 100$. Donde CrD es cromo en dieta, PD PC en dieta,

PH PC en heces, CrH cromo en heces, ED energía en dieta, EH energía en heces, porcentajes expresados en base seca.

Los resultados de los análisis fisicoquímicos se compararon mediante una prueba de T-student, por otra parte para los resultados de digestibilidad se utilizó un ANOVA de dos factores; ambos análisis con una $P < 0.05$ y empleando el programa SPSS.

5.8.10 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre

la estabilidad de la dieta y rendimiento de *L. vannamei* (Experimento 10)

El diseño del experimento 10 consideró 4 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, deficiente chícharo verde 2 sin pos-condicionar, deficiente chícharo verde 2 pos-condicionada, 0.40% DL-Met y 0.40% DL-Met + aqua-sabor. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión. En el bioensayo de crecimiento con duración de 35 días se asignaron 3 acuarios (replicados) con 5 animales cada uno en jaulas individuales. Los juveniles se alimentaron a saciedad, en un porcentaje de la biomasa, iniciando con 10%. La ración diaria fue entregada en 3 alimentaciones de cuando menos 2 pelets a las 10:00 y 18:00 hrs.

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, perfil de AA (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, Ile, Leu, Val, His, Phe, Gly, Ser, Pro, Ala, Asp y Glu), ABS, PMS, PPC y PAA. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, GP, TCE, Suv, biomasa, Cons, EA y TEP. Los resultados de los análisis fisicoquímicos y de los bioensayos de crecimiento se compararon mediante un ANOVA, seguido de una comparación de medias por el método Duncan. Además se comparó la adición de cada proceso mediante pruebas de t-student. Los análisis anteriores se realizaron utilizando una $P < 0.05$ y empleando el programa SPSS. La sobrevivencia se comparó por medio de una prueba de χ^2 cuando se considera al individuo como la unidad experimental (binomial).

5.8.11 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de *L. vannamei*

(Experimento 11)

El diseño del experimento 11 consideró 7 tratamientos, correspondientes a cada una de las dietas descritas anteriormente, dietas de referencias de chícharo verde y pescado, además de las dietas con proporciones de 95:5, 85:15, 70:30, 55:45 y 40:60 de las referencias de chícharo y pescado respectivamente. Los parámetros físicos de los alimentos se evaluaron con 3 replicados a los 60 minutos de inmersión. En el bioensayo de crecimiento con duración de 29 días se asignaron 4 acuarios (replicados) con 15 animales en cada uno. Los juveniles se alimentaron en exceso en tres ocasiones, a las 08:00, 14:00 y 18:00 hrs, con un mínimo de 2 pelets por camarón. Los muestreos de camarón se realizaron a los 0, 2, 4, 8, 15, 22 and 29 días, tomando al azar uno o dos de 5 animales muestreados, en función del peso seco del músculo (sin tubo intestinal).

Las variables evaluadas en los alimentos fueron análisis proximal, perfil de AA (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, Ile, Leu, Val, His, Phe, Gly, Ser, Pro, Ala, Asp, Glu, Tyr y Tau), ABS, PMS, PPC y PE. Las variables evaluadas en el bioensayo fueron peso, GP, TCE, Suv y biomasa. La contribución de nitrógeno dietario del pea y del pescado fue obtenida mediante un modelo de mezclado de dos fuentes con un isótopo (Phillips and Gregg, 2001). El modelo presenta un coeficiente que permite distinguir el cambio isotópico debido a crecimiento (k) obtenido con base en el crecimiento observado mediante la ecuación $k = \log (\text{peso}_F (\text{g}) / \text{peso}_I (\text{g})) / \text{días}$; también se representa el cambio isotópico debido al recambio metabólico (m) obtenido de una regresión iterativa no lineal.

La estimación de la contribución de materia seca de cada uno de los ingredientes al crecimiento corregida por los factores de discriminación y con base en los valores de nitrógeno estable de cada una de las dietas y del músculo de camarón se realizó mediante las siguientes ecuaciones (Fry, 2006): $f_{\text{total1}} = f_1 \cdot W_2 / (f_1 \cdot W_2 + f_2 \cdot W_1)$; $f_{\text{total2}} = 1 - f_{\text{total1}}$; $f_1 = (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumidor}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{fuente2}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{fuente1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{fuente2}})$; $f_2 = 1 - f_1$. Donde f_{total1} , f_{total2} son

los porcentajes de contribución total de las fuentes 1 y 2, mientras W1 y W2 representan el contenido elemental de cada una de las fuentes.

Los resultados de la composición proximal, la prueba de lixiviación y el experimento de crecimiento fueron comparados mediante un análisis de varianza (Anova) seguido de una comparación múltiple de medias por el método de Duncan. La comparación de la contribución esperada vs. la contribución observada de nitrógeno dietario (chícharo o pescado) al nitrógeno incorporado en el músculo de camarón se realizó mediante una prueba de Chi-cuadrada para bondad de ajuste. Los parámetros requeridos por el modelo de Hesslein fueron estimados a partir de una regresión no lineal iterativa.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente

(Experimento 1)

El contenido de nutrientes encontrado en los alimentos fue semejante al calculado en las formulaciones. El contenido de PC en la dieta de base fue de 33.2%, con 0.65% de Met (1.93% de PC), mientras que la dieta suplementada con MHA presentó 0.10% del análogo y 0.73% de Met total (2.17% de PC). Por otro lado, la dieta comercial utilizada como control externo presentó 29.8% de PC con 0.53% Met (1.78% de PC) lo cual fue inferior al 2.4% recomendado por Akiyama (Tabla 12).

Tabla 12. Contenido nutricional analizado de los alimentos (% base húmeda) del experimento 1.

Nutrientes (%)	Deficiente Soyal		0.14% MHA		Control Positivo	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
Humedad	8.39	0.06	9.34	0.12	10.96	0.01
Proteína	33.2	0.85	33.5	3.25	29.8	1.23
Ceniza	6.74	0.01	5.87	0.00	5.90	0.02
Lípidos+ Fibra + ELN	51.7		51.3		53.3	
Energía (Kcal/g)	4.97	0.14	5.02	0.15	4.63	0.14
Met	0.64		0.65		0.53	
MHA	--		0.10		--	
Met total	0.64		0.73		0.53	

Los análisis físicos mostraron una ABS de agua marina de 92% para la dieta deficiente en Met, pero que disminuyó a 81.6% con la dieta suplementada con MHA. La lixiviación de los alimentos fue semejante en PMS (18.9%), PPC (9.15%), PE (22.9%); por el contrario la PMet (41%), PLys (41%) y PArg (30%) se redujeron en 4, 7 y 8 unidades para la dieta suplementada con MHA. El análisis de MHA mostró, que el análogo se lixivia en un 57% en un alimento de tipo comercial a base de soya (Tabla 13).

Tabla 13. Absorción de agua marina y pérdida de nutrientes por lixiviación de los alimentos después de 60 minutos de inmersión en el experimento 1 (% en base húmeda).

(%)	Deficiente Soyal		0.14% MHA		Control Positivo	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
ABS	92.8	0.08	81.6	0.05	72.8	0.06
PMS	20.5	3.26	17.3	2.89	17.9	2.08
PPC	8.8	0.65	9.5	2.25	16.1	2.01
PE	21.6	0.06	24.1	4.53	20.9	0.58
PMet	41.1		37.3		--	
PMHA		--	57.3		--	
PLys	41.0		33.8		--	
PArg	30.0		22.1		--	

ABS absorción de agua; PMS pérdida de materia seca; PPC pérdida de proteína, PE pérdida de energía, PMet pérdida de metionina, PMHA pérdida de MHA, PLys pérdida de lisina, PArg pérdida de arginina.

Los resultados de la evaluación zootécnica de las dietas se presentan en la Tabla 14. No se encontraron diferencias zootécnicas en el crecimiento (peso, GP, TCE), supervivencia, biomasa y TCA. La UNP presentó diferencias marginales ($P=0.053$) entre la dieta deficiente y la dieta comercial. Los parámetros que presentaron diferencias significativas fueron el consumo ($P=0.009$) y la TEP ($P=0.009$). El consumo y el contenido de proteína fue mayor con las dietas de base y suplementada con MHA respecto de la dieta comercial, disminuyendo así su TEP.

Tabla 14. Evaluación de los parámetros zootécnicos del bioensayo del experimento 1.

	Deficiente Soyal		0.14% MHA		Control Externo		ANOVA P=			
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS				
Peso (g)	2.22	0.15	2.31	0.16	2.14	0.04	0.217			
GP (%)	186	21.1	204	23.5	176	4.92	0.148			
TCE	3.74	0.26	3.97	0.29	3.63	0.06	0.161			
Suv (%)	97.73	4.55	95.45	5.25	90.91	12.86	0.532			
Biomasa (g)	24.35	0.93	24.82	2.10	21.36	2.96	0.099			
Consumo (g/ind)	2.36	0.09	b	2.41	0.16	b	2.13	0.01	a	0.009
TCA	1.65	0.15		1.56	0.12		1.56	0.03		0.487
TEP	1.74	0.16	a	1.92	0.14	a	2.15	0.04	b	0.004
UNP	0.22	0.06	a	0.28	0.04	ab	0.30	0.01	b	0.053

El peso promedio inicial de los animales fue de 0.77 ± 0.02 g (n=4). Se utilizó $\alpha = 0.05$ en los estadísticos. P es la probabilidad de Anova a los 28 días. Las letras indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha = 0.05$).

La composición del cuerpo de camarón entre los tratamientos del bioensayo fue semejante y tampoco presentó grandes cambios con respecto a la de los camarones analizados al inicio del bioensayo (Tabla 15).

Tabla 15. Composición del cuerpo del camarón (% en base húmeda) al inicio y final del bioensayo en el experimento 1.

	Deficiente Soyal							
	Iniciales		0.14% MHA		Comercial			
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS		
Humedad (%)	76.3	0.2	78.3	1.29	80.4	1.49	78.7	0.15
Proteína (%)	15.9	1.11	15.1	0.89	13.8	1.38	14.7	0.28
Energía (Kcal/g)	4.12	0.06	4.68	0.13	4.43	0.33	4.69	0.50

6.2 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente

(Experimento 2)

Las dietas del experimento dos mostraron una composición semejante a la esperada (Tabla 16). En los alimentos la humedad fue de 12-13%, la PC de 30%, los lípidos de 10%, la ceniza de 5.3%, la fibra de 1.47-1.56% y el ELN de 40%. La energía del alimento fue de 4.1 Kcal/g. En la dieta de base el contenido de Met fue de 0.44% (1.47% de PC), mientras en la dieta suplementada con MHA fue de 0.45% para un 0.76% de Met total (2.48% de PC) (esto, considerando que toda la MHA se encontraba no lixiviada y el porcentaje de actividad de Met del HMTBA) cubriendo las recomendaciones para la industria.

Tabla 16. Contenido nutricional analizado de los alimentos (% base húmeda) del experimento 2.

Nutrientes (%)	Deficiente	0.36%
	Soya2	MHA
	\bar{x}	\bar{x}
Humedad	13.0	12.0
Proteína	30.0	30.7
Lípidos	10.3	10.3
Ceniza	5.26	5.28
Fibra	1.56	1.47
ELN	40.0	40.3
Energía (Kcal/g)	4.11	4.13
Met	0.44	0.45
MHA	-	0.36
Met total	0.44	0.76

La ABS de los alimentos fue de 262%. La PMS fue de 6.9 y 6.8% para la dieta deficiente y suplementada con MHA respectivamente. La pérdida de Met (23%) y Lys (55%) fue muy semejante entre dietas, sin embargo la PArg fue de 15.7% para la dieta deficiente y 23.2% para la dieta suplementada (Tabla 17).

Tabla 17. Absorción de agua marina (%) y pérdida de nutrientes por lixiviación (%) en los alimentos del experimento 2.

	Deficiente Soya 2		0.36% MHA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
ABS	262	5.60	262	4.00
PMS	6.94	0.30	6.81	0.60
PMet	22.7		24.4	
PLys	54.1		55.2	
PArg	15.7		23.2	

ABS Absorción de agua; PMS pérdida de materia seca, PMet pérdida de metionina, PLys pérdida de lisina, PArg pérdida de arginina

No presentaron diferencias significativas los parámetros de crecimiento (peso, GP, TCE), supervivencia, biomasa, TCA, TEP y UNP. Solo el consumo fue significativamente mayor ($P=0.002$) con la dieta suplementada con MHA, aunque numéricamente fueron de 2.71 y 2.76 g/individuo (Tabla 18). Por otro lado el contenido promedio de proteína en el cuerpo del camarón al inicio y al final del bioensayo entre los tratamientos no presentó diferencias significativas como en el experimento anterior (Tabla 19).

Tabla 18. Evaluación de los parámetros zootécnicos del bioensayo del experimento 2.

	Deficiente Soya 2		0.36% MHA		T-student P=
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
Peso final (g)	1.57	0.03	1.53	0.09	0.423
GP (%)	303	7.00	292	22.00	0.413
TCE	3.98	0.05	3.90	0.17	0.406
Suv (%)	83.0	7.00	75.0	7.00	0.134
Biomasa (g)	15.7	1.30	13.8	1.70	0.130
Consumo (g/individuo)	2.71	0.02	a 2.76	0.01	b 0.002
TCA	2.30	0.04	2.43	0.19	0.238
PER	1.60	0.03	1.61	0.12	0.454
NPU	0.28	0.03	0.27	0.03	0.760

El peso inicial de los animales fue de 0.39 ± 0.00 g ($n=3$). P es la probabilidad de Anova a los 14 días. Las letras indican diferencias definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Tabla 19. Composición del cuerpo de camarón (% en peso vivo).

	Iniciales		Deficiente Soya 2		0.36% MHA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
Humedad	78.9		77.9	0.43	78.3	0.40
Proteína	14.1		19.4	0.95	19.0	0.70

6.3 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)

Las dietas del experimento 3 mostraron diferencias significativas en ABS (<0.001) y PMS (<0.001) (Tabla20). La dieta de base presentó mayor ABS (221%), que las dietas suplementadas con DL-Met. La dieta con menor PMS fue aquella sin pre-acondicionar suplementada con DL-Met encapsulada en agar con relación 1:1 (6.2%), progresivamente le siguieron la dieta de base (7.43%), la dieta pre-acondicionada con relación 1:1 (9.7%) y la dieta con en encapsulado 2:1 (10.9%).

Tabla 20. Absorción de agua marina (ABS %) y pérdida de materia seca (PMS %) por lixiviación en los alimentos del experimento 3.

	Deficiente Soya 3		Encapsulado 1 sin preacondicionar		Encapsulado 1 preacondicionado		Encapsulado 2		ANOVA P=				
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS					
ABS	221	3.48	d	187	4.89	c	145	14.16	a	168	3.89	b	<0.001
PMS	7.43	0.60	b	6.17	0.27	a	9.73	0.70	c	10.92	0.83	d	<0.001

Se utilizó $\alpha=0.05$ en los estadísticos.

A partir de los resultados de ABS y PMS, se analizó el contenido de Met en el alimento a base de soya 3 suplementado con DL-Met encapsulada en agar 1:1 antes y después de lixiviar, también se analizó la concentración de Met en el agua marina. El

contenido de Met en la dieta con DL-Met encapsulada antes de lixiviar fue de 0.83%, después de lixiviar fue de 0.62% y el contenido de Met encontrado en el agua fue de 0.21%, es decir se encontró la complementariedad en el material lixiviado (Tabla 21). Las pérdidas de Met calculadas a partir de la concentración de Met en el alimento ya lixiviado (24.5%) y en el agua de lixiviación (25.1) por este método correspondieron adecuadamente.

Tabla 21. Contenido relativo de Met en la dieta suplementada con DL-Met encapsulada en agar antes y después de lixiviar por 60 minutos así como en el agua de lixiviación (% base seca del alimento antes de lixiviar), además de la PMet calculada a partir de ellas.

Encapsulado 1 sin pre acondicionar		
Muestra	%Met	% Met lixiviada
Alimento	0.83	--
Alimento lixiviado	0.62	24.5
Agua de lixiviación	0.21	25.1

6.4 Perfil de AA de carcas de *L. vannamei* como patrón de referencia (Experimento 4)

Los animales crecidos bajo las cuatro condiciones de cultivo tuvieron un perfil de AA similar (Tabla 22). Se encontraron bajas desviaciones estándar al interior de cada grupo y entre los grupos de cultivo. El perfil de AA del cuerpo entero de *L. vannamei* reportado como referencia fue calculado a partir del promedio de las 18 muestras colectadas, El perfil de AA del cuerpo entero de camarón propuesto como patrón de referencia se presenta en la Tabla 22 expresado en %, en relación a un 91.5% de materia seca, donde la PC fue de $72.0 \pm 1.58\%$ y la suma de AA fue de $64 \pm 1.52\%$.

Tabla 22. Perfil de AA, AA totales y el contenido de proteína del cuerpo entero de camarón, de los 4 grupos de camarones colectados en el experimento 4 (% 91.5 de materia seca).

AA en el cuerpo entero	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Patrón de AA propuesto (N=18)	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
Met	1.43	0.05	1.50	0.05	1.58	0.07	1.55	0.08	1.51	0.08
Cys	0.74	0.02	0.64	0.02	0.73	0.03	0.72	0.04	0.71	0.04
Met+Cys	2.17	0.07	2.14	0.06	2.30	0.10	2.28	0.12	2.22	0.10
Lys	4.92	0.09	4.8	0.12	4.82	0.20	4.72	0.21	4.83	0.16
Thr	2.56	0.07	2.71	0.04	2.61	0.08	2.6	0.09	2.61	0.08
Arg	5.38	0.13	5.12	0.14	4.87	0.34	4.83	0.39	5.09	0.33
Ile	2.73	0.05	2.73	0.08	2.77	0.06	2.75	0.09	2.74	0.06
Leu	4.69	0.11	4.82	0.10	4.82	0.15	4.78	0.16	4.77	0.13
Val	3.15	0.08	3.14	0.06	3.24	0.06	3.22	0.15	3.18	0.09
His	1.68	0.04	1.72	0.03	1.62	0.06	1.59	0.04	1.66	0.06
Phe	3.23	0.07	3.10	0.04	3.06	0.08	3.03	0.04	3.12	0.10
Gly	5.58	0.10	4.90	0.13	5.17	0.10	4.90	0.13	5.20	0.31
Ser	2.68	0.08	2.72	0.03	2.63	0.11	2.60	0.11	2.66	0.09
Pro	3.67	0.10	4.68	0.08	5.30	0.32	5.22	0.23	4.61	0.74
Ala	4.09	0.09	4.04	0.08	4.39	0.19	4.42	0.12	4.22	0.21
Asp	7.21	0.20	7.18	0.12	6.89	0.23	6.79	0.18	7.04	0.25
Glu	10.1	0.29	10.1	0.18	10.1	0.28	9.99	0.36	10.07	0.26
AAT	63.9	1.57	63.9	1.20	64.6	1.93	63.7	2.34	64.0	1.52
PC	74.0	0.57	72.9	1.08	72.1	1.91	71.7	1.93	72.8	1.58

Aminoácidos totales (AAT); Proteína cruda (PC)

Los AAI con niveles más grandes de desviación estándar fueron Arg y Lys, pero la Arg tuvo el coeficiente de variación más alto (0.06). Por otro lado las desviaciones estándar de los AAD fueron más amplias que las observadas en los AAI; los coeficientes de variación más elevados fueron para Gly (0.06), Cys, Ala (0.06) y Pro (0.16). La proporción de AA totales frente a la proteína cruda en el carcas fue de 91%, así que hubo un 9% restante de AA no analizados y compuestos nitrogenados (e. g. ácidos nucleicos, aminas, amidas y quitina).

6.5 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de

soya/trigo (Experimento 5)

6.5.1 Análisis químico de las dietas

El contenido proximal promedio de las dietas experimentales en PC, energía, lípidos y cenizas (Figura 6 y Tabla 23) fue de 30.5%, 4.68 KCal/g, 10.3%, 4.7%, ligeramente menor en PC (32%) y mayor en lípidos y ceniza (8.8 y 3.1%) con respecto al valor esperado. Por otra parte la dieta comercial contra la cual se compararon, presentó valores inferiores en PC y en lípidos (29.4% y 8%). Las dietas experimentales resultaron significativamente diferentes en lípidos ($P=0.002$), ceniza ($P<0.000$) y humedad ($P<0.000$) con respecto a la dieta comercial; el contenido de humedad varió de 10 - 17% entre las dietas de experimentales.

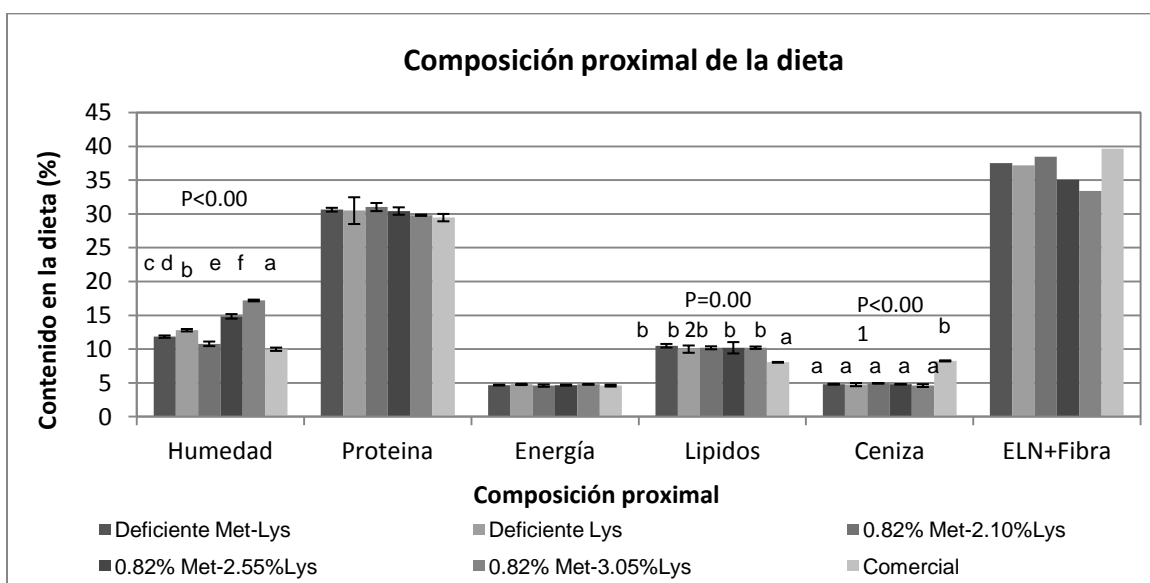


Figura 6. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 5. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

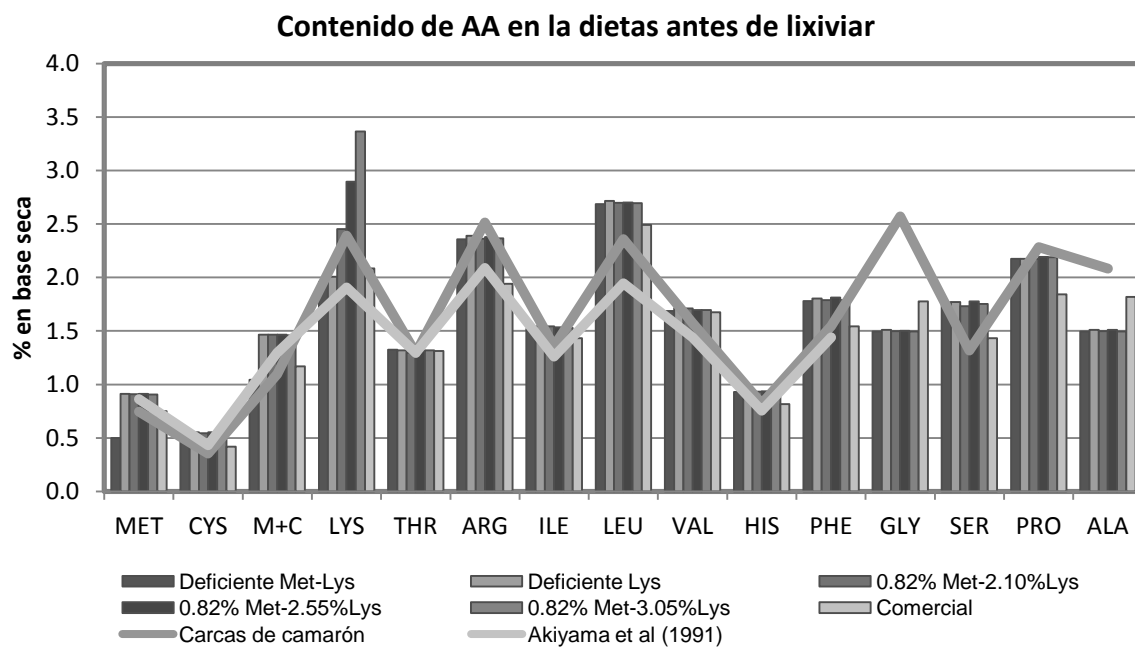
El perfil teórico y analizado de AA de las dietas en base húmeda se presenta en la Tabla 23, el análisis efectuado por Degussa arrojó valores ligeramente superiores, pero con la misma tendencia a los valores esperados (Tabla 23 y Figuras 7 y 8). Las dietas suplementadas con Met-agar y con dosis crecientes de Lys presentaron 0.91% de Met, así como 2.01, 2.45, 2.90 y 3.37% de Lys mientras el resto de los AA permanecieron sin cambios importantes. Las diferencias con respecto a la dieta control fueron de 0.4% para Met y 0.45, 0.9 y 1.38% para Lys, que correspondieron con los niveles suplementados. La dieta comercial mostró valores mayores de Met y Lys, pero menores para Cys y Arg con respecto a la dieta de base. Las diferencias en el contenido de AA se pierden por lixiviación a partir de los primeros 15 minutos de inmersión en el agua, quedando valores de 0.43-0.46% de Met en las dietas experimentales y de 0.60% en la dieta comercial, mientras los valores de Lys fueron de 1.44 a 1.61% para las dietas experimentales y de 1.42% para la comercial. La proporción relativa de Lys/Met en la dietas experimentales y la dieta comercial (2.2 a 3.9) fue muy similar a la relación esperada, excepto por la dieta control que fue ligeramente menor (3.9 vs. 4.2) (Tabla 23).

Tabla 23. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 15 minutos de inmersión en agua del experimento 5.

Nutrientes (%)	Deficiente Met-Lys		Deficiente Lys		0.82% Met-		0.82% Met-		0.82% Met-		Comercial		ANOVA						
	0.42% Met-1.7%Lys	0.82% Met-1.7%Lys	0.82% Met-1.7%Lys	0.82% Met-1.7%Lys	2.10%Lys	2.55%Lys	2.55%Lys	3.05%Lys	3.05%Lys	3.05%Lys	Comercial	P=							
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS							
Humedad	11.8	0.18	c	12.8	0.18	d	10.7	0.34	b	14.8	0.34	e	17.2	0.12	f	9.98	0.24	a	<0.001
Proteína	30.6	0.28		30.5	1.98		31	0.6		30.4	0.55		29.8	0.1		29.4	0.55		0.366
Lípidos	10.5	0.28	b	10.1	0.55	b	10.3	0.22	b	10.3	0.84	b	10.2	0.18	b	8.06	0.07	a	0.002
Ceniza	4.82	0.07	a	4.75	0.23	a	4.94	0.06	a	4.8	0.01	a	4.61	0.22	a	8.26	0.89	b	<0.001
Fibra + ELN	42.3			41.9			43.1			39.7			38.2			44.3			
Energía (Kcal/g)	4.68	0.06		4.78	0.09		4.61	0.18		4.69	0.08		4.78	0.04		4.6	0.15		0.253
Contenido total teórico de Met	0.42			0.82			0.82			0.82			0.82			0.72			-
Contenido total teórico de Cys	0.46			0.46			0.46			0.46			0.46			0.36			-
Contenido total teórico de Lys	1.7			1.7			2.1			2.55			3.05			1.97			-
Contenido total teórico de Arg	2.09			2.09			2.09			2.09			2.09			2.09			-
Relación Lys/Met	4.15			2.1			2.65			3.21			3.77			2.74			-
Contenido analizado de Met	0.5			0.91			0.91			0.91			0.91			0.75			-
Contenido analizado de Cys	0.55			0.55			0.55			0.55			0.55			0.55			-
Contenido analizado de Lys	1.96			2.01			2.45			2.9			3.37			2.08			-
Contenido analizado de Arg	2.36			2.39			2.36			2.38			2.36			1.94			-
Relación Lys/Met	3.93			2.2			2.7			3.18			3.71			2.78			-
Contenido de Met después de lixiviar	0.43			0.44			0.45			0.46			0.45			0.6			-
Contenido de Cys después de lixiviar	0.53			0.52			0.54			0.54			0.54			0.4			-
Contenido de Lys después de lixiviar	1.45			1.44			1.53			1.59			1.61			1.42			-
Contenido de Arg después de lixiviar	2.16			2.14			2.22			2.23			2.22			1.71			-
Relación Lys/Met	3.37			3.27			3.4			3.46			3.58			2.42			-

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

A)



B)

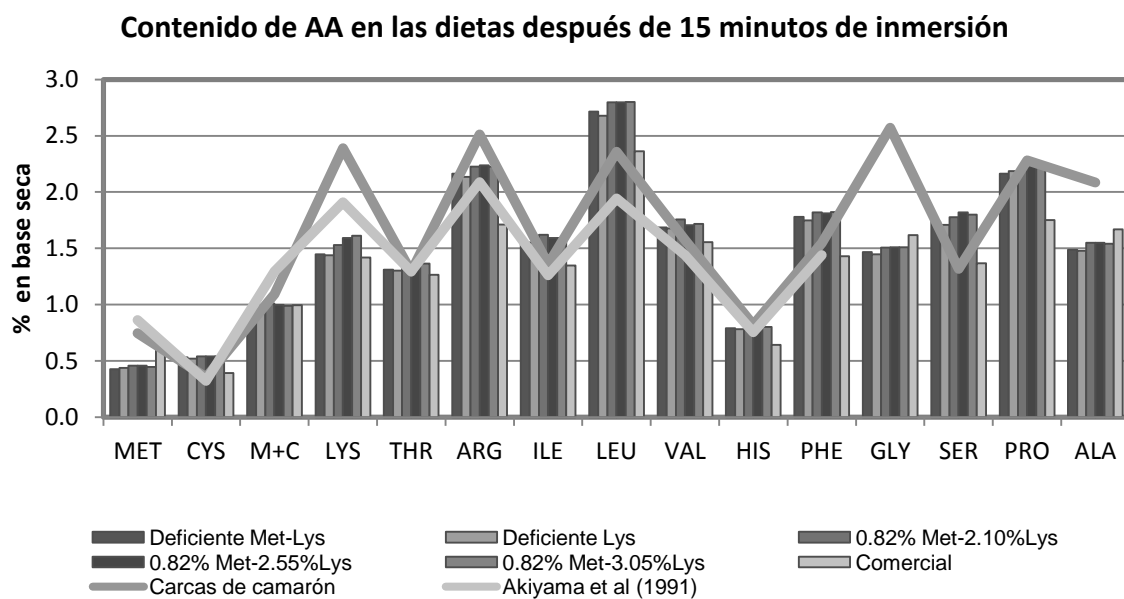


Figura 7. Contenido de AA en las dietas antes y después de 15 minutos de inmersión (% en base seca).

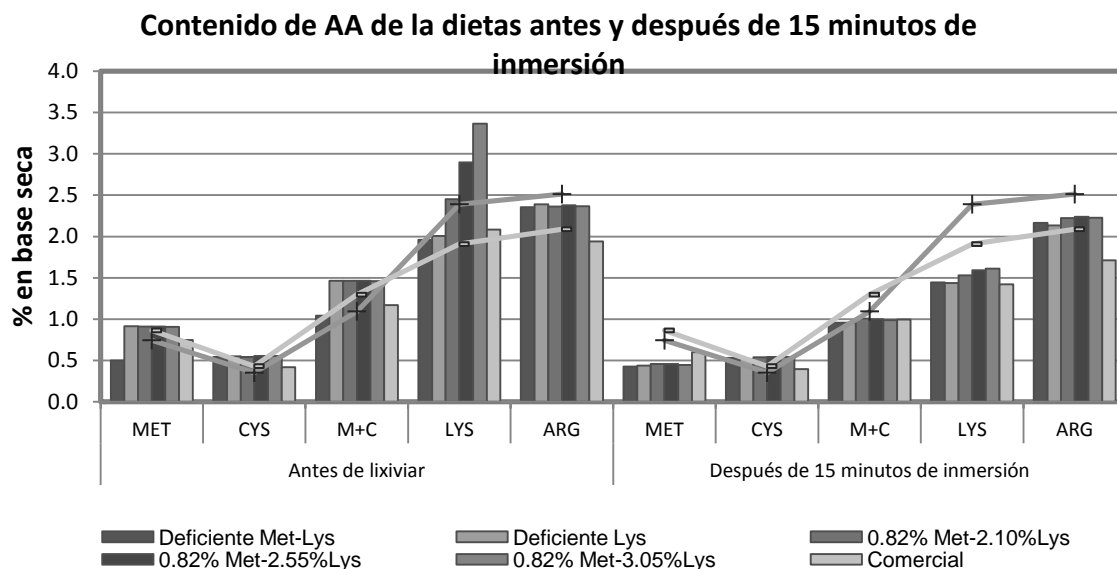


Figura 8. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 15 minutos de inmersión en agua (% en base seca).

6.5.2 Análisis físico de las dietas

6.5.2.1 Capacidad de absorción de Agua

En los diferentes tiempos de inmersión en agua (15, 30 y 60 minutos) se observó una correlación positiva entre el incremento en el contenido de agar en la dietas y la capacidad de absorción de agua marina, con excepción de la dieta 0.82% Met-2.10%Lys que muestra valores fuera de la tendencia (Tabla 24 y Figura 9).

Tabla 24. Correlación entre el contenido de Agar y la ABS (% en base húmeda) de agua marina en la dietas del experimento 5.

Dieta	ABS					R2	P	
	Deficiente Met-Lys	Deficiente Lys	0.82% Met-2.10%Lys	0.82% Met-2.55%Lys	0.82% Met-3.05%Lys			
Contenido de agar en la dieta (%)	4.45	4.05	3.61	3.15	2.7			
Tiempo de inmersión (minutos)	15	132	145	98	122	114	0.272	0.368
	30	152	157	107	129	127	0.355	0.289
	60	159	178	113	136	132	0.357	0.288

R2 es el coeficiente de determinación y P es la probabilidad de la regresión al considerar todos los tratamientos en cada tiempo de inmersión. ($\alpha=0.05$).

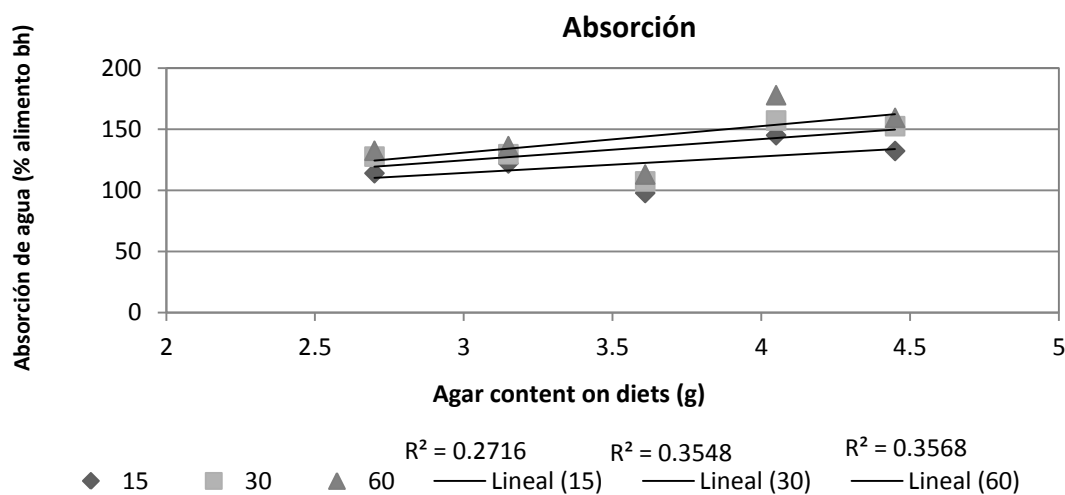


Figura 9. Correlación entre el contenido de dietario de agar y la absorción de agua del pelet (% bh dieta). R^2 es el coeficiente de determinación.

6.5.2.2 Estabilidad de las dietas en el agua

6.5.2.2.1 Pérdida de materia seca

La PMS entre las dietas experimentales se presenta en la Tabla 25 y en las Figuras 10 y 11, fue alrededor de 8, 10 y 15% a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en agua marina, excepto para la dieta con Met y 2.10% de Lys que presentó valores de lixiviación 5% por encima del resto de las dietas experimentales. La dieta comercial perdió 9, 11 y 13% respectivamente. La PMS entre las dietas presentó diferencias significativas

($P < 0.000$) en cada periodo de inmersión. Por otra parte la cinética de PMS fue similar para todas las dietas con una pérdida fuertemente marcada en los primeros 15 minutos, alcanzando un plano o pérdidas mínimas entre los 15 y 60 minutos (Figura 10).

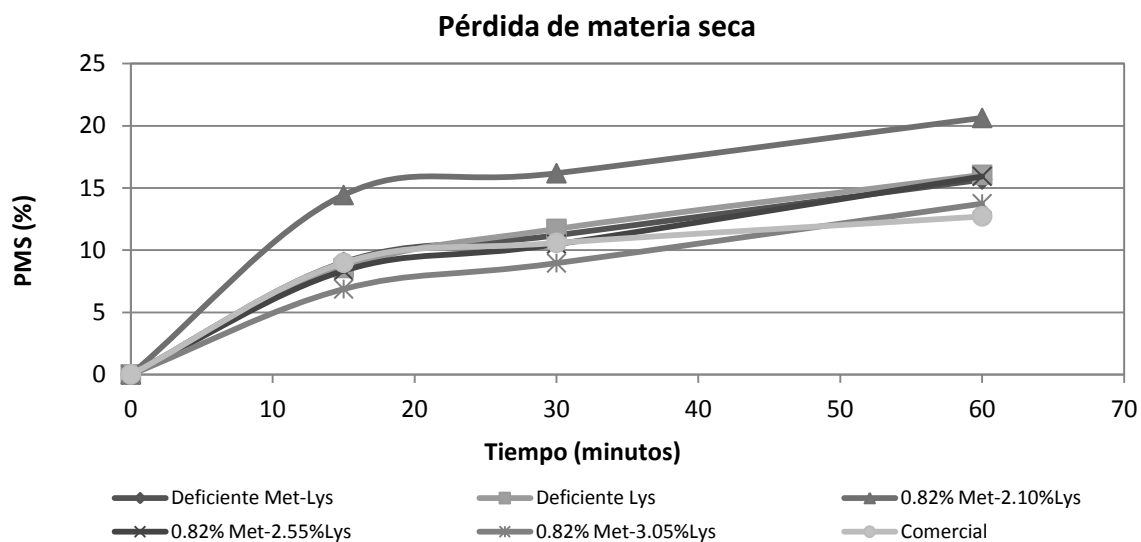


Figura 10. Cinética de pérdida de materia seca, método tradicional.

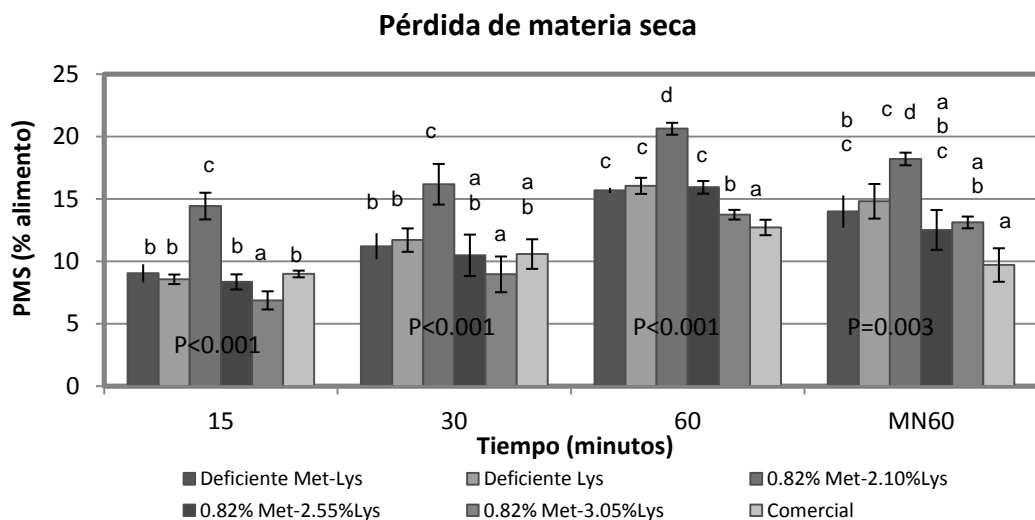


Figura 11. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos, así como a 60 minutos con el nuevo método. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntas homogéneas definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha = 0.05$).

Se compararon (t-student) los valores de PMS obtenidos mediante los dos métodos de lixiviación, mostrando PMS significativamente mayores con el MT para la dieta suplementada con 0.45% Lys ($P=0.002$) y la dieta comercial ($P=0.047$) y es presentada en la Figura 12. En el MT se requirió de cinco replicados para conseguir la cantidad de muestra necesaria en base seca para los análisis proximales mientras que el MN solo requirió de tres.

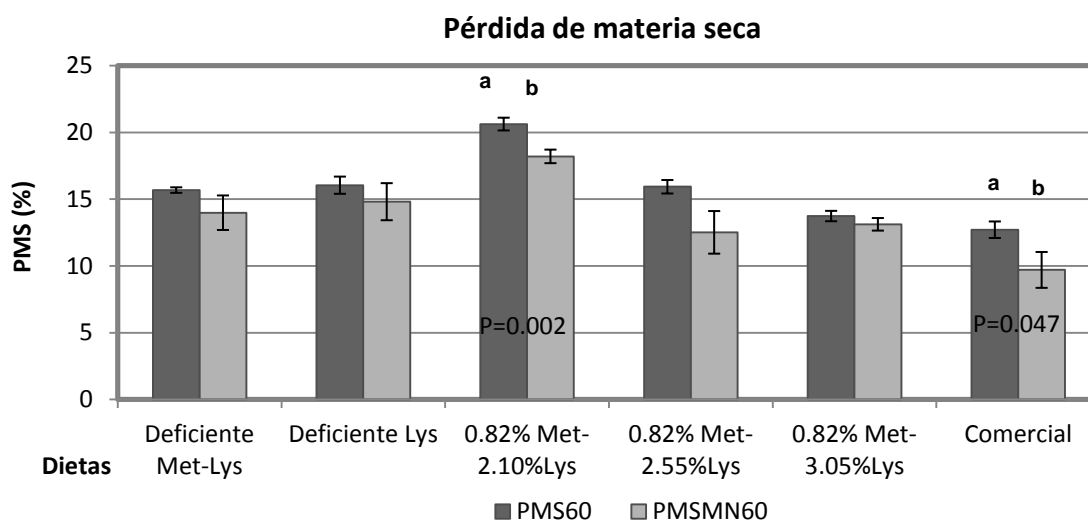


Figura 12. Comparación de la pérdida de materia seca a 60 minutos, por método tradicional o nuevo. P es la probabilidad de t-student. Las barras indican la desviación estándar y las letras diferencias entre los métodos de lixiviación ($\alpha= 0.05$).

6.5.2.2.2 Pérdida de proteína

La PPC varió ampliamente a los 15 (6-11%), 30 (7-12%) y 60 minutos de inmersión (10-15%) sin presentar una buena correlación con la PMS, encontrándose diferencias significativas ($P<0.005$) en cada uno de los periodos de lixiviación. La PPC fue mayor para las dietas suplementadas con 0.4% Met y con 0.4% Met + 0.45% de Lys. La cinética de lixiviación de PC fue parecida a la cinética de PMS con pérdidas fuerte en los primeros 15 minutos de inmersión en agua (Figuras 13 y 14).

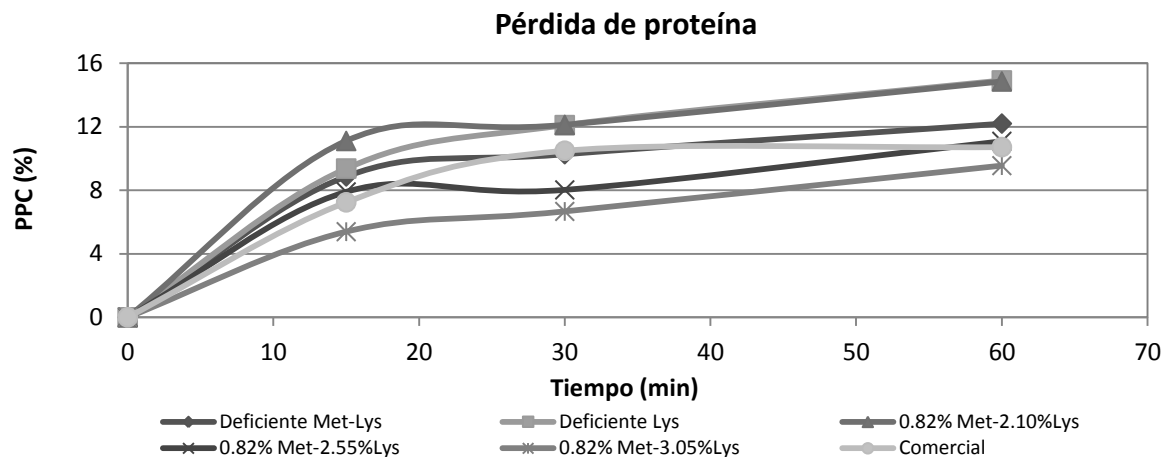


Figura 13. Cinéticas de la pérdida de proteína (% bs), método tradicional.

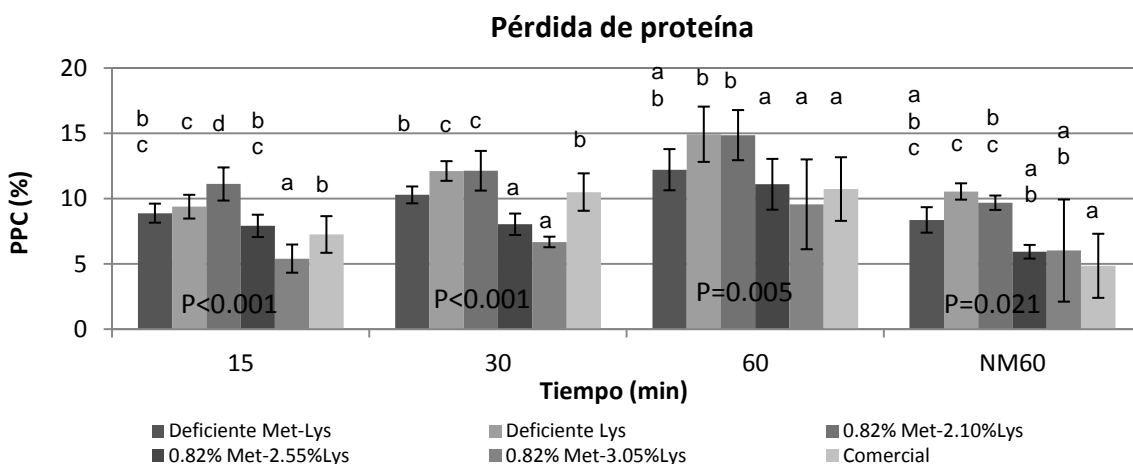


Figura 14. Comparación de pérdida de proteína (% bs) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos, así como a 60 minutos con el nuevo método. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

La comparación (t-student) entre los métodos de lixiviación, mostró una PPC significativamente mayor ($P \leq 0.027$) con el MT a excepción de la dieta 5 (adicionada con

1.35% Lys) que tuvo desviaciones muy amplias (Figura 15). De manera general la variabilidad en la PPC se redujo con el MN a diferencia de lo ocurrido con la PMS.

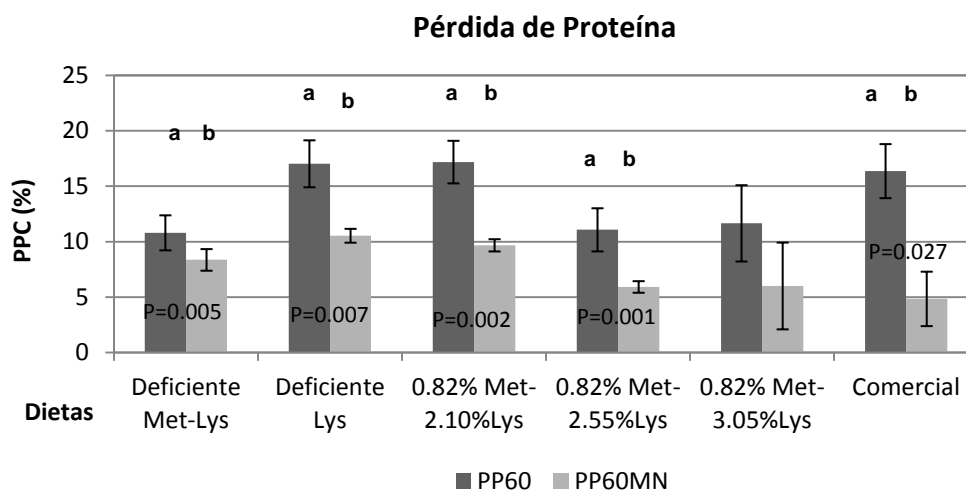


Figura 15. Comparación de la pérdida de proteína (%bs) a 60 minutos, por método tradicional o nuevo. P es la probabilidad de t-student. Las barras indican la desviación estándar y las letras diferencias entre los métodos de lixiviación ($\alpha=0.05$).

Tabla 25. PMS y PPC a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión con el MT y 60 minutos con el MN en los alimentos del experimento 5.

		Deficiente Met-Lys			Deficiente Lys			0.82% Met-2.10%Lys			0.82% Met-2.55%Lys			0.82% Met-3.05%Lys			Comercial		ANOVA General P	
		\bar{x}	DS		\bar{x}	DS		\bar{x}	DS		\bar{x}	DS		\bar{x}	DS		\bar{x}	DS		
PMS	15minutos	9.0	0.72	b	8.6	0.38	b	14.4	1.07	c	8.3	0.61	b	6.9	0.73	a	9.0	0.27	b	<0.001
	30minutos	11.2	1.05	b	11.7	0.94	b	16.2	1.63	c	10.5	1.66	ab	9.0	1.43	a	10.6	1.19	ab	<0.001
	60minutos	15.7	0.21	c	16.0	0.64	c	20.6	0.48	d	15.9	0.50	c	13.7	0.39	b	12.7	0.62	a	<0.001
	60minutos MN	14.0	1.29	bc	14.8	1.39	c	18.2	0.51	d	12.5	1.60	abc	13.1	0.47	ab	9.7	1.34	a	0.003
T-student 60 minutos P=		0.148			0.258			0.002			0.057			0.316			0.047			
PPC	15minutos	8.9	0.73	bc	9.4	0.91	c	11.1	1.27	d	7.9	0.86	bc	5.4	1.08	a	7.2	1.40	b	<0.001
	30minutos	10.3	0.65	b	12.1	0.75	c	12.1	1.52	c	8.0	0.82	a	6.7	0.40	a	10.5	1.43	b	<0.001
	60minutos	12.2	1.58	ab	14.9	2.12	b	14.9	1.92	b	11.1	1.95	a	9.6	3.44	a	10.7	2.44	a	0.005
	60minutos MN	8.4	0.98	abc	10.5	0.63	c	9.7	0.55	bc	5.9	0.52	ab	6.0	3.91	ab	4.8	2.45	a	0.021
T-student 60 minutos P=		0.005			0.007			0.002			0.010			0.267			0.027			

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

6.5.2.2.3 Pérdida de aminoácidos

Las dietas experimentales ya lixiviadas perdieron sus diferencias y presentaron un perfil muy semejante con 0.44, 0.56, 1.59 y 2.28% para Met, Cys, Lys y Arg a partir de los 15 minutos (Tabla 26). La dieta comercial lixiviada arrojó 0.60, 0.41, 1.44 y 1.73% para los respectivos AA. Cuando se toma en consideración los contenidos de AA en las dietas después de lixiviar sus proporciones Lys/Met fueron de 3.8 para la dieta deficiente, 3.6, 3.6, 3.5 y 3.7 para las dietas suplementadas con Met y Lys y 2.4 para la dieta comercial.

La PMet se detuvo en todas las dietas a partir de los 15 minutos de inmersión en el agua (Tabla 26 y Figura 16). La dieta deficiente presentó una PMet total de 22% “a pesar de estar constituida de proteínas integra”. Las dietas suplementadas con DL-Met perdieron cerca de 56% de la Met total y la comercial 27%. La PMet encapsulada fue casi completa, en promedio de 97% desde los 15 minutos (Figura 17). No se apreció una diferencia de PMet al comparar los métodos de lixiviación.

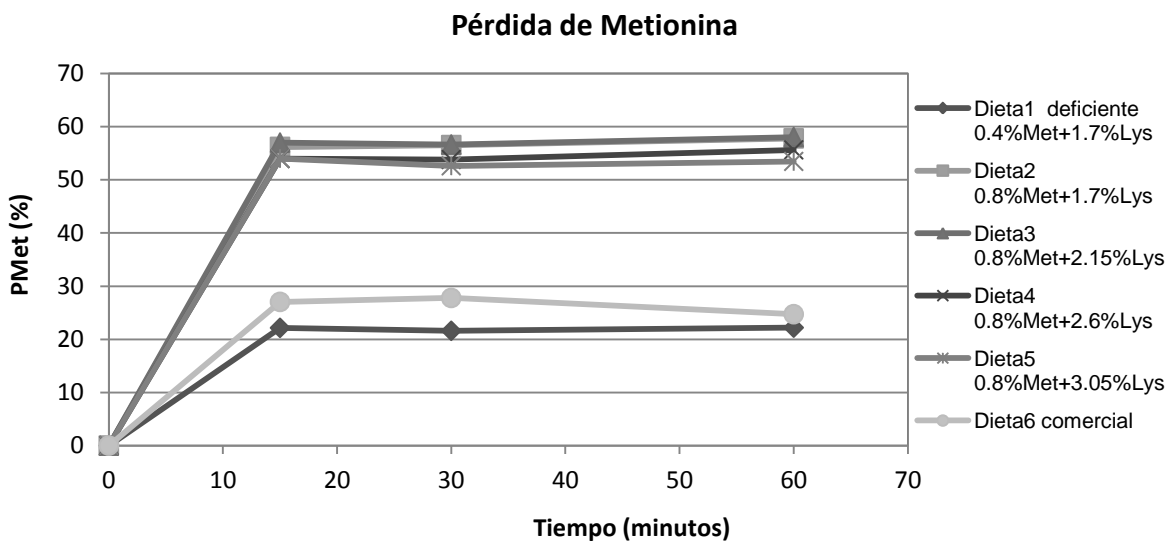


Figura 16 Cinética de la pérdida de Met (%).

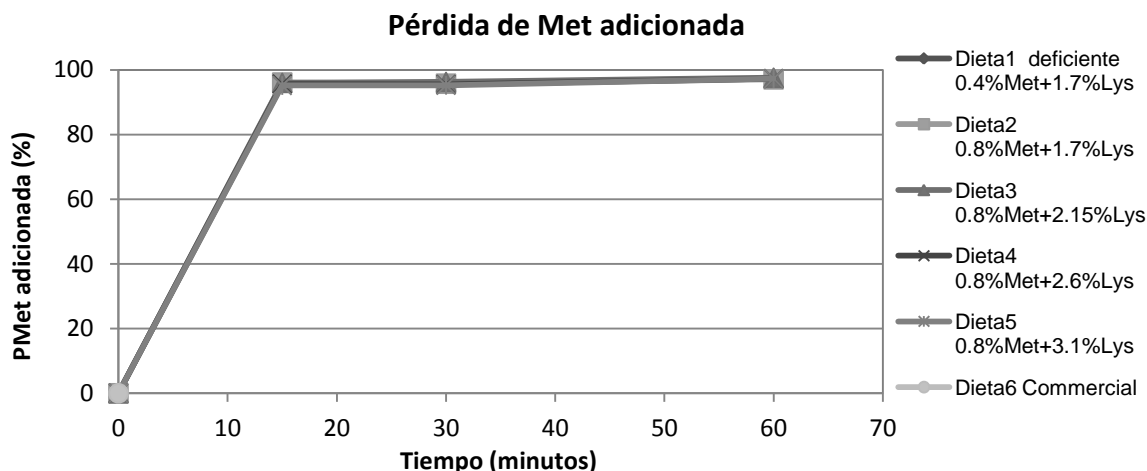


Figura 17. Cinética de la pérdida de DL-Met encapsulada (%).

La PLys total fue ligeramente mayor a los 15 minutos (33-50%) que a los 30 minutos (24-50%), aunque semejante a la obtenida a los 60 minutos (22-52%). En promedio las dietas deficientes en Lys perdieron un 27% de Lys total, aquellas adicionadas con Lys perdieron entre 41 y 55% en función de la cantidad adicionada y la dieta comercial tuvo una PLys de 33% (Figura 18). La PLys fue casi completa: del 96% a una hora de inmersión para todas las dietas que la contenían (Figura 19). No hubo una diferencia notable de PLys al comparar los métodos de lixiviación.

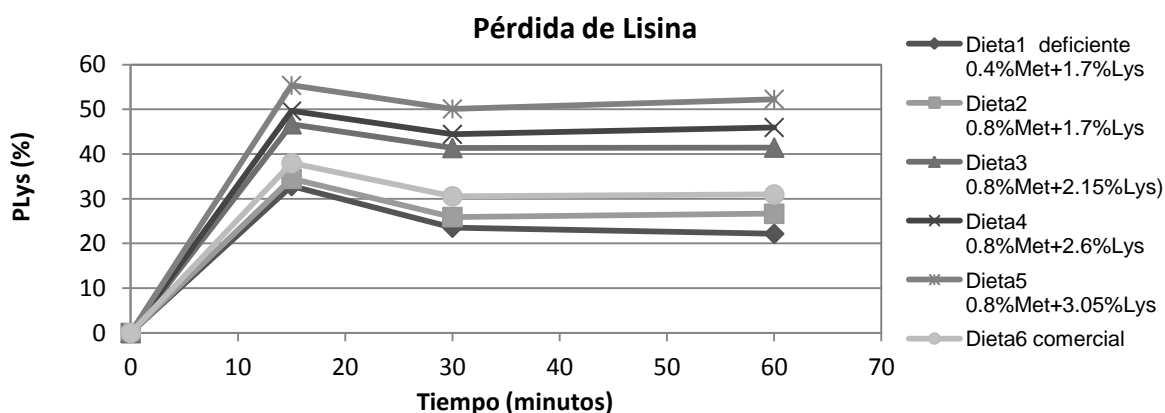


Figura 18. Cinética de la pérdida de Lys (%).

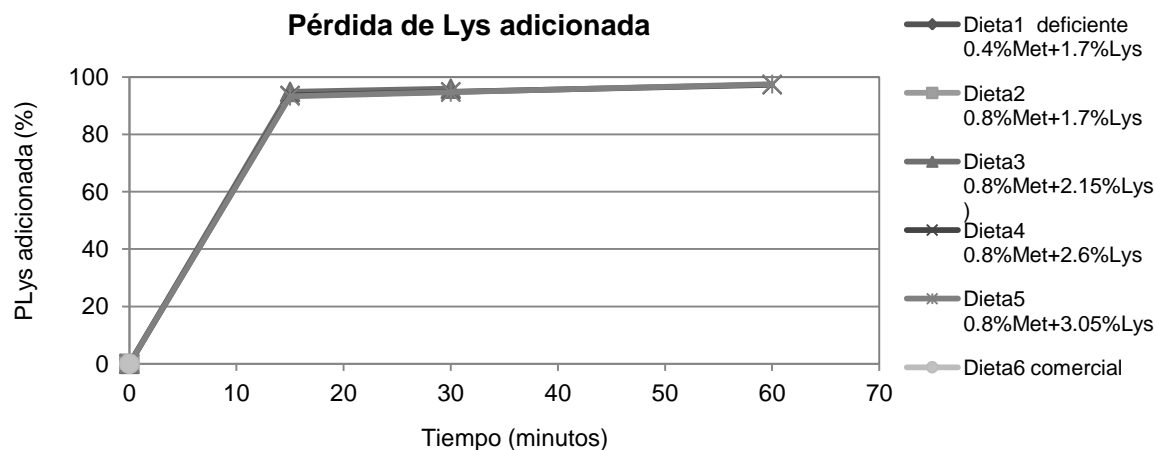


Figura 19. Cinética de la pérdida de HCl-Lys encapsulada (%).

Las pérdidas de Arg (figura 20) y Cys (figura 21) permanecieron relativamente constantes desde los 15 minutos alrededor de 17% (rango mínimo-máximo del 10 al 20%) y 13% (9-19%) respectivamente en las dietas experimentales, con un comportamiento semejante a la PMet.

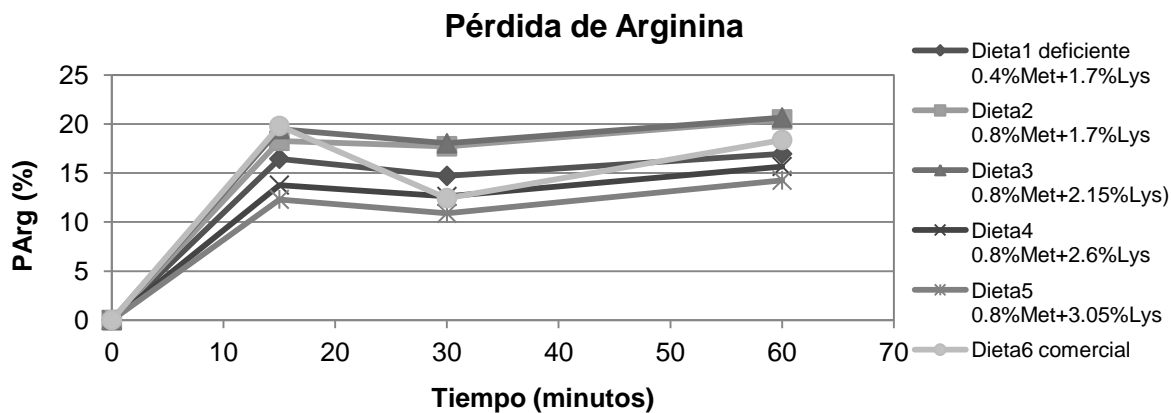


Figura 20. Cinética de la pérdida de Arg (%).

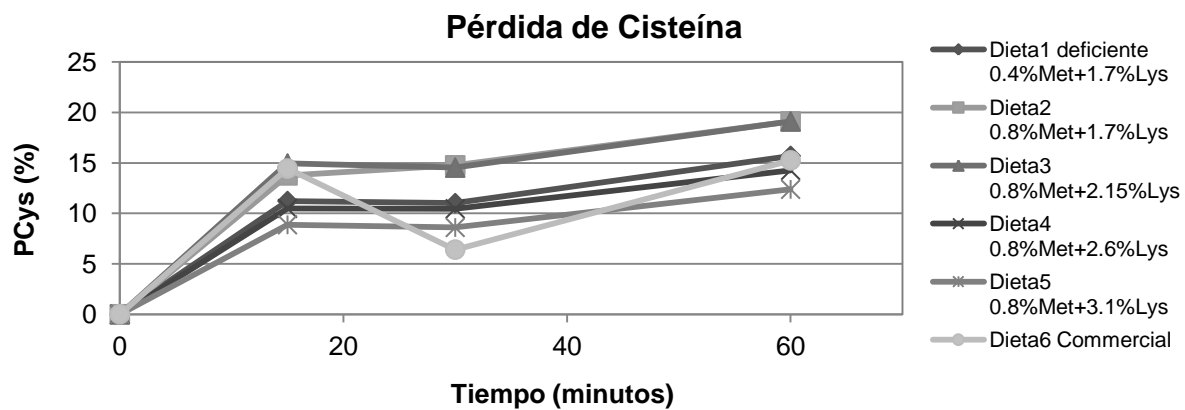


Figura 21. Cinética de la pérdida de Cys (%).

Tabla 26. Porcentaje de PMet total, PMet encapsulada, PLys total, PLys encapsulada, PArg y PCys a los 15, 30 y 60 minutos con el MT y a los 60 minutos con el MN.

		Deficiente Met-Lys	Deficiente Lys	0.82% Met- 2.10%Lys	0.82% Met- 2.55%Lys	0.82% Met- 3.05%Lys	Comercial
PMet	15min	22	56	57	54	54	27
	30 min	22	57	57	54	53	28
	60 min	22	58	58	56	53	25
	60 min NM	26	59	60	58	59	28
PMet encapsulada	15min	-	96	96	96	95	-
	30 min	-	96	96	95	95	-
	60 min	-	97	98	97	97	-
	60 min NM	-	96	96	97	97	-
PLys	15min	33	34	47	50	55	38
	30 min	24	26	41	44	50	31
	60 min	22	27	41	46	52	31
	60 min NM	28	32	47	53	60	38
PLys encapsulada	15min	-	-	95	94	93	-
	30 min	-	-	96	95	95	-
	60 min	-	-	-	97	98	-
	60 min NM	-	-	95	96	96	-
PArg	15min	16	18	19	14	12	20
	30 min	15	18	18	13	11	12
	60 min	17	20	21	16	14	18
	60 min NM	16	20	20	16	18	19
PCys	15min	11	14	15	10	9	14
	30 min	11	15	15	10	9	6
	60 min	16	19	19	14	12	15
	60 min NM	12	15	15	11	14	12

6.5.3 Resultados zootécnicos

Los resultados de parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con estas dietas experimentales se presentan en la Tabla 27. A partir de los 35 días de bioensayo se presentaron diferencias significativas en la Suv; los camarones alimentados con la dieta de base deficiente en Met y Lys presentaron una baja Suv (68%) a los 35 días ($P=0.010$) y llegando a ser de 62.5% a los 42 días ($P=0.050$). La adición de Met encapsulada a la dieta de base mejoró significativamente ($P=0.050$) la Suv de 62.5 a 81.3%. En contraste, la adición creciente de Lys encapsulada a la dieta suplementada con Met redujo la Suv llegando a ser el efecto significativo ($P=0.050$), pasando de 81.3 a 79.2, 75 y 58.4% de Suv para los niveles de suplementación de Lys de 2.10, 2.55 y 3.05% a los 42 días. El alimento comercial produjo una Suv intermedia con respecto al resto de las dietas experimentales (77.1%). Cabe mencionar, que en general la mortalidad o la baja sobrevivencia en los tratamientos: deficiente en Met y con exceso máximo de Lys se asoció a la presencia de canibalismo (Figura 22 y Tabla 27).

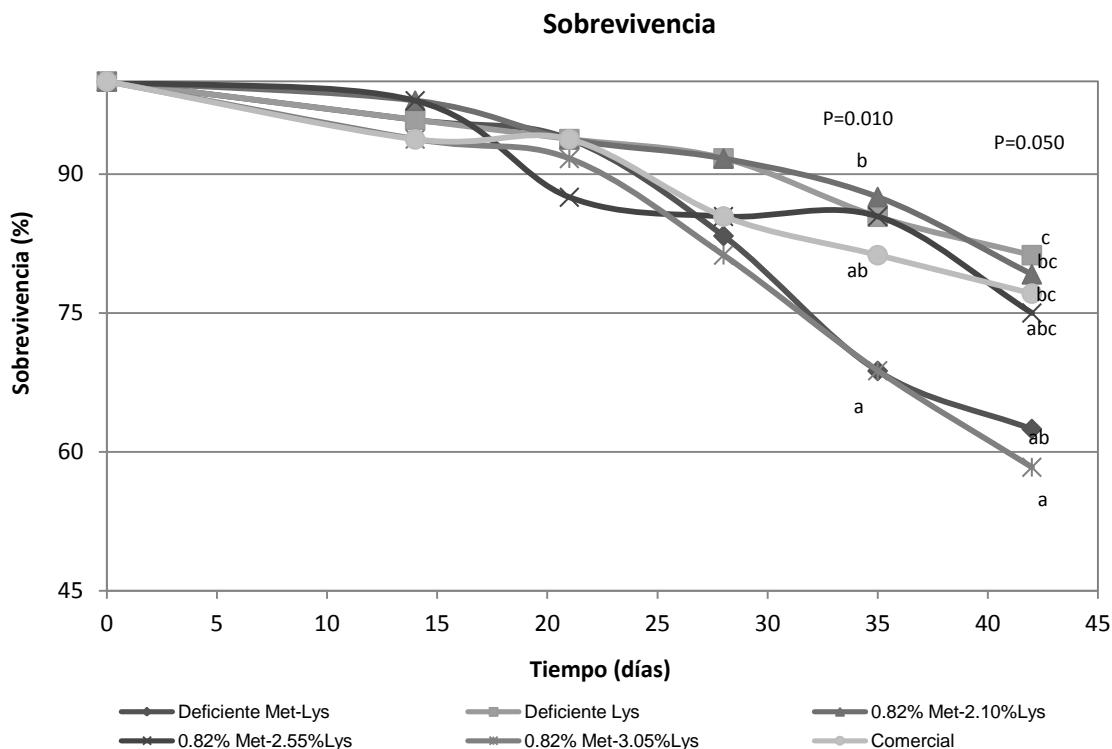


Figura 22. Sobrevivencia (12 animales iniciales) entre todos los tratamientos, de 0-42 días. Deficiente en Met-Lys (0.42% de Met y 1.65% de Lys) y Deficiente en Lys (0.82% de Met y 1.65% de Lys). P es la probabilidad de Anova a los 35 y 42 días. Las letras en el mismo tiempo indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

La adición de Met y de Met con niveles crecientes de Lys a la dieta control deficiente en Met y en Lys no generó diferencias significativas en ningún otro parámetro zootécnico, excepto en la UNMet que disminuyó significativamente ($P=0.001$) con la adición de Met (pasando de 0.60-0.33) y se incrementó gradualmente (de 0.33-0.46) con la adición creciente de Lys, hasta ser significativamente diferente con el nivel máximo de inclusión (Figura 23 y tabla 27). El alimento comercial presentó un valor de UNMet semejante a los de las dietas experimentales suplementadas con Met y Lys pero inferior al alimento deficiente en Met.

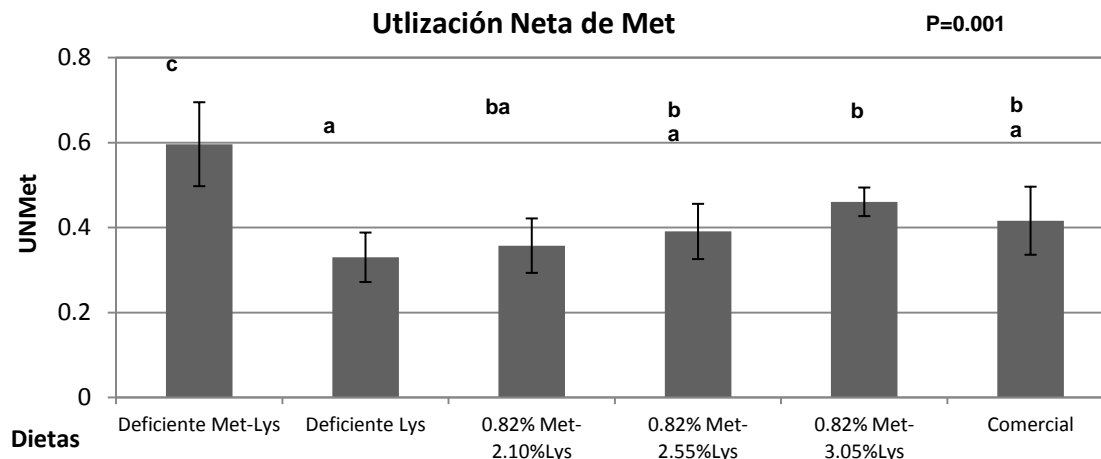


Figura 23. Comparación de UNMet promedio (n=4) de los camarones experimentales a 42 días de experimentación. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Cuando se considera a la dieta suplementada con Met como la dieta control, se observa que la adición de Lys mejoró significativamente a lo largo del experimento la TCA en base húmeda y seca (2.61 a 2.03 y 2.27 a 1.68) (Figura 24 y Tabla 27); así como la UNP pasando de 0.40 a 0.59 con el máximo de inclusión de Lys (Figura 25). El alimento comercial presentó una TCA de las más bajas y una UNP semejante a la de la dieta suplementada con el máximo nivel de Lys y superior al resto.

El alimento comercial presentó diferencias significativas con respecto a los alimentos experimentales en consumo ($P=0.004$ en base húmeda y $P=0.048$ en base seca) y TCA en base húmeda ($P=0.024$), siendo menos consumido (4.32g/individuo) y produciendo una mejor tasa de conversión (en base húmeda, 1.92) que los alimentos experimentales (4.86-5.36 g/individuo y 2.03-2.61, respectivamente).

Al comparar las dietas con y sin suplementar Met-agar, mediante una prueba de T-student la Suv ($P=0.018$) y la UNMet ($P=0.004$) confirman ser los únicos parámetros que presentaron diferencias significativas. La suplementación de Met mejoró la Suv en 30% y disminuyó en 55% la UNMet (Tabla 28).

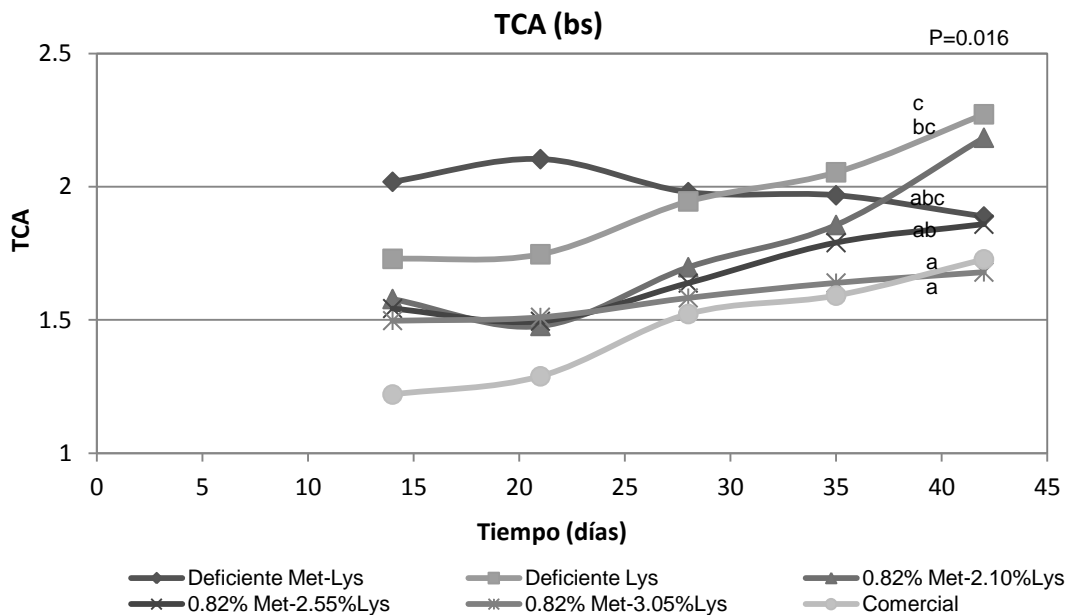


Figura 24. TCA promedio (alimento consumido bs/incremento en peso) ($n=4$), de las 6 dietas, de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

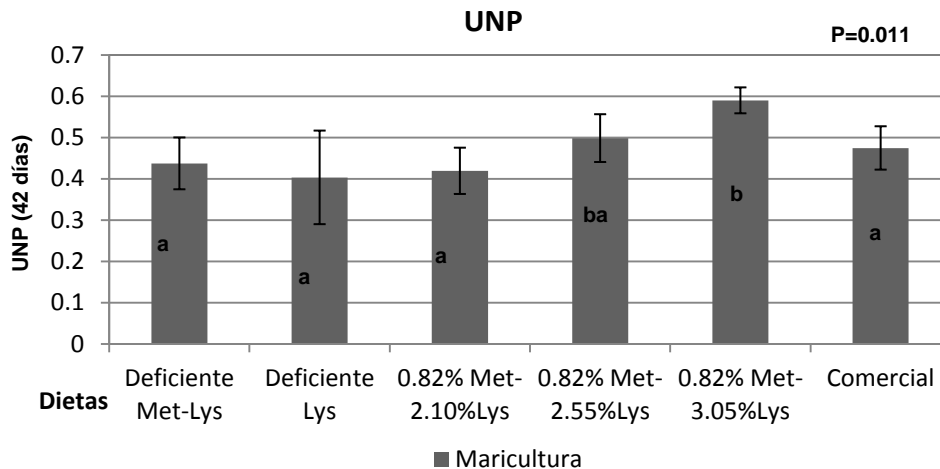


Figura 25. UNP promedio calculada en base a los análisis proximales realizados por maricultura para todos los tratamientos, a los 42 días de experimentación. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

Tabla 27. Resultados zootécnicos a los 42 días de experimentación entre las dietas experimentales y la dieta comercial del bioensayo del experimento 5.

Dia42	Deficiente Met-Lys		Deficiente Lys		0.82% Met-2.10%Lys		0.82% Met-2.55%Lys		0.82% Met-3.05%Lys		Comercial		ANOVA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	General P=	T-student P=
	Peso	2.98	0.28	2.64	0.29	2.84	0.37	3.19	0.34	3.34	0.33	2.98	0.4	0.101
Gpeso	322	39.6	272	40.6	300	52.2	350	49.1	372	45.6	320	55	0.093	0.129
TCE	3.42	0.23	3.12	0.26	3.29	0.33	3.57	0.27	3.69	0.24	3.4	0.3	0.102	0.131
Suv (%)	62.5	8.35 ab	81.3	7.99 c	79.2	16 bc	75	13.6 abc	58.4	9.64 a	77.1	10.5 bc	0.050	0.018
Biomasa	24.5	6.74	24.2	3.32	23.4	2.57	29	6.36	27.6	4.39	26.2	7.41	0.666	0.941
Conbh	4.83	0.4 b	4.96	0.27 b	5.08	0.14 b	5.36	0.36 b	5.29	0.15 b	4.32	0.5 a	0.004	0.307
Conbs	4.26	0.36 ab	4.33	0.23 ab	4.53	0.12 b	4.56	0.3 b	4.37	0.13 b	3.89	0.45 a	0.048	0.762
Conlix MT	3.59	0.3	3.63	0.2	3.6	0.1	3.84	0.25	3.78	0.11	3.4	0.39	0.223	0.822
ConlixMN	3.84	0.23	3.54	0.31	3.74	0.1	3.72	0.24	3.79	0.27	3.74	0.44	0.754	0.177
TCAbh	2.14	0.27 bc	2.61	0.28 c	2.45	0.46 bc	2.18	0.23 abc	2.03	0.23 ab	1.92	0.12 a	0.025	0.055
TCAbs	1.89	0.24 abc	2.27	0.24 c	2.18	0.41 bc	1.86	0.2 ab	1.68	0.19 a	1.73	0.11 a	0.016	0.065
TCAlix MT	1.59	0.2 ab	1.91	0.2 b	1.73	0.32 ab	1.56	0.17 a	1.45	0.16 a	1.51	0.09 a	0.053	0.070
TCAlix MN	1.71	0.32	1.87	0.35	1.82	0.43	1.53	0.31	1.45	0.11	1.68	0.34	0.446	0.534
TEP maricultura	1.98	0.47	1.97	0.41	2.01	0.3	2.16	0.33	2.06	0.42	2.02	0.35	0.983	0.994
TEP Degussa	1.89	0.46	2.01	0.42	2.02	0.3	1.98	0.31	1.87	0.38	1.93	0.34	0.991	0.729
UNP Maricultura	0.44	0.06 a	0.4	0.11 a	0.42	0.06 a	0.5	0.06 ab	0.59	0.03 b	0.47	0.05 a	0.011	0.619
UNP Degussa	0.4	0.07	0.36	0.06	0.42	0.08	0.44	0.07	0.5	0.03	0.43	0.09	0.145	0.5
UNMet	0.6	0.1 c	0.33	0.06 a	0.36	0.06 ab	0.39	0.06 ab	0.46	0.03 b	0.42	0.08 ab	0.001	0.004
UNLys	0.48	0.08	0.46	0.08	0.41	0.07	0.38	0.06	0.38	0.03	0.46	0.09	0.26	0.688

El peso inicial de los animales fue de 0.7 ± 0.03 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. T-student P es a la probabilidad de T-student al considerar los tratamientos sin y con Met. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

Al considerar únicamente los tratamientos (dosis-respuesta) con niveles crecientes de Lys encapsulada en agar en el análisis estadístico (Anova y Duncan) (Tabla 28) se confirma el efecto negativo de la inclusión de Lys sobre la Suv (Figura 12), aunque las diferencias se vuelven marginalmente significativas ($P=0.080$). Sin embargo, en términos de correlación el coeficiente de correlación entre los niveles de Lys y Suv resultó elevado y significativo ($R=0.91$ y $P=0.090$) (Figura 27). Por otro lado los parámetros de crecimiento (peso en la Figura 28, GP en la Figura 29 y TCE en la figura 30), TCA (Figura31), UNP (Figura 32) y UNMet (Figura 33) se mejoraron significativamente al aumentar el nivel de inclusión de la Lys (Tabla 28). El contenido de Lys en las dietas se correlacionó de forma positiva con la GP ($R=0.914$ y $P=0.66$) y la UNMet ($R=0.914$ y $P=0.66$) Figuras 34 y 35, respectivamente. Pero todos estos parámetros presentaron una correlación negativa con la sobrevivencia, excepto la TCA (Figuras 36 y 37). Finalmente si se consideran los niveles de Lys lixiviados no se encontró ninguna correlación.

Tabla 28. Resultados zootécnicos a los 42 días de experimentación producidos por las dietas con diferentes niveles de Lys en el bioensayo del experimento 5.

Dia42	Deficiente Lys		0.82% Met- 2.10%Lys		0.82% Met- 2.55%Lys		0.82% Met- 3.05%Lys		ANOVA Lys P=				
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS					
Peso	2.64	0.29	a	2.84	0.37	ab	3.19	0.34	b	3.34	0.33	b	0.043
Gpeso	272	40.6	a	300	52.2	ab	350	49.1	b	372	45.6	b	0.040
TCE	3.12	0.26	a	3.29	0.33	ab	3.57	0.27	b	3.69	0.24	b	0.049
Suv	81.3	8.00		79.2	16.0		75	13.6		58.4	9.60		0.080
Biomasa	25.6	2.79		27.4	8.39		28.7	6.16		23.2	3.18		0.560
Conbh	3.11	0.10		3.17	0.06		3.31	0.23		3.19	0.08		0.252
Conbs	4.33	0.23		4.53	0.12		4.56	0.30		4.37	0.13		0.349
Conlix	3.63	0.20		3.60	0.10		3.84	0.25		3.78	0.11		0.233
ConlixN	3.54	0.31		3.74	0.10		3.72	0.24		3.79	0.27		0.510
TCAbh	2.61	0.28		2.45	0.46		2.18	0.23		2.03	0.23		0.089
TCAbs	2.27	0.24	b	2.18	0.41	b	1.86	0.20	ab	1.68	0.19	a	0.032
TCAlixMT	1.91	0.20		1.73	0.32		1.56	0.17		1.45	0.16		0.062
TCAlixMN	1.87	0.35		1.82	0.43		1.53	0.31		1.45	0.11		0.225
TEPM	1.97	0.41		2.01	0.30		2.16	0.33		2.06	0.42		0.901
TEPD	1.84	0.39		1.88	0.28		2.12	0.33		2.05	0.42		0.938
UNP													
Maricultura UNP	0.43	0.09	a	0.47	0.10	a	0.49	0.09	ab	0.51	0.07	b	0.011
Degussa	0.40	0.11	a	0.42	0.06	ab	0.50	0.06	ab	0.59	0.03	b	0.058
UNMet	0.33	0.06	a	0.36	0.06	a	0.39	0.06	ab	0.46	0.03	b	0.036
UNLys	0.46	0.08		0.41	0.07		0.38	0.06		0.38	0.03		0.349

El peso inicial de los animales fue de 0.7 ± 0.03 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

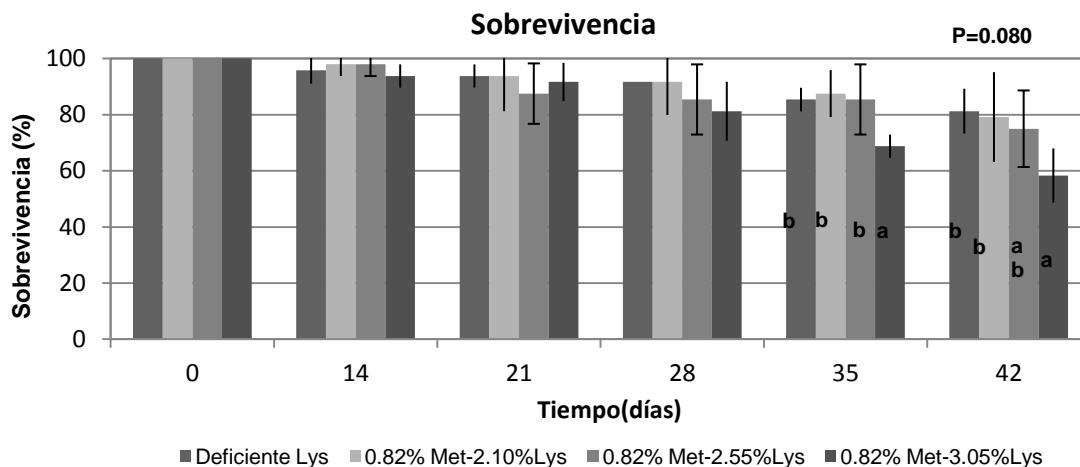


Figura 26. Sobrevivencia (%) de camarones que consumieron (12 animales iniciales) las dietas con dosis crecientes de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35), de 0-42 días de experimentación. P es la probabilidad de Anova a los 42 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

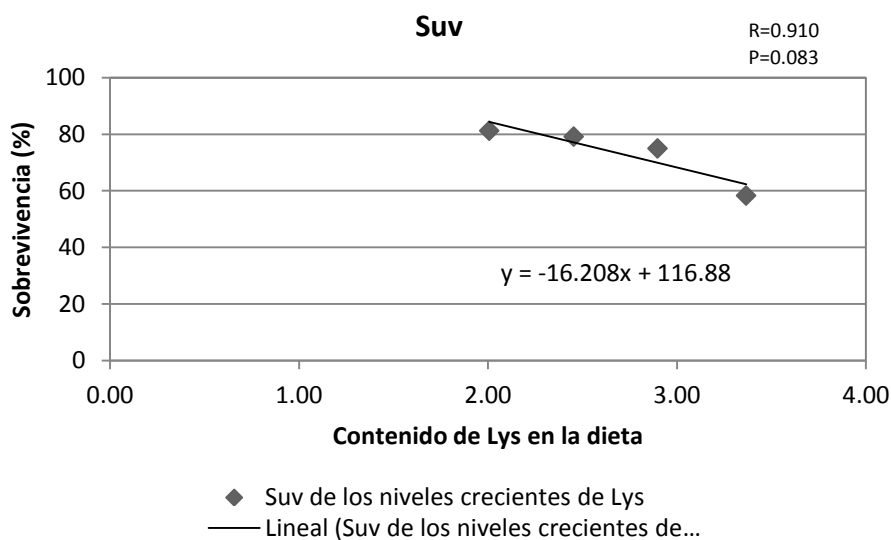


Figura 27. Correlación de la Suv promedio de los camarones alimentados con los tratamientos con el contenido creciente de Lys analizada (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días. R es el coeficiente de correlación y P es la probabilidad de la pendiente.

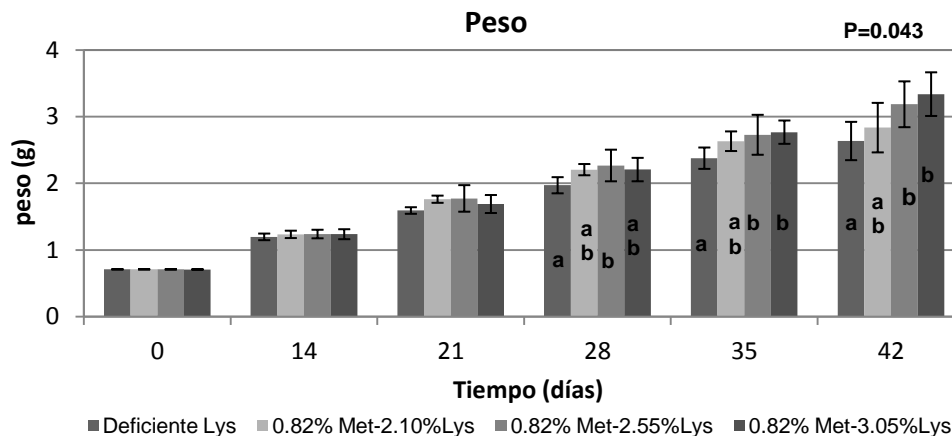


Figura 28. Incremento en el peso promedio del camarón (g, n=4) alimentados con dosis crecientes de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha= 0.05$).

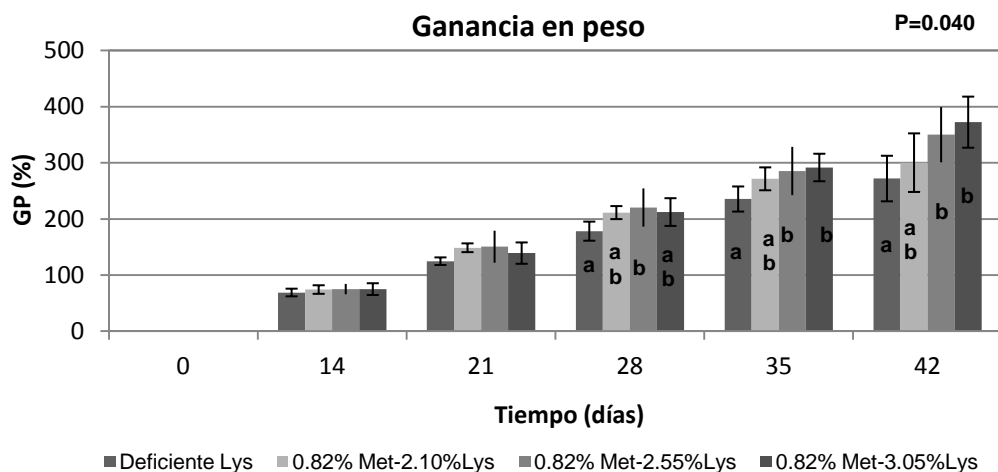


Figura 29. GP promedio (% en vivo, n=4) de las dietas con dosis crecientes de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha= 0.05$).

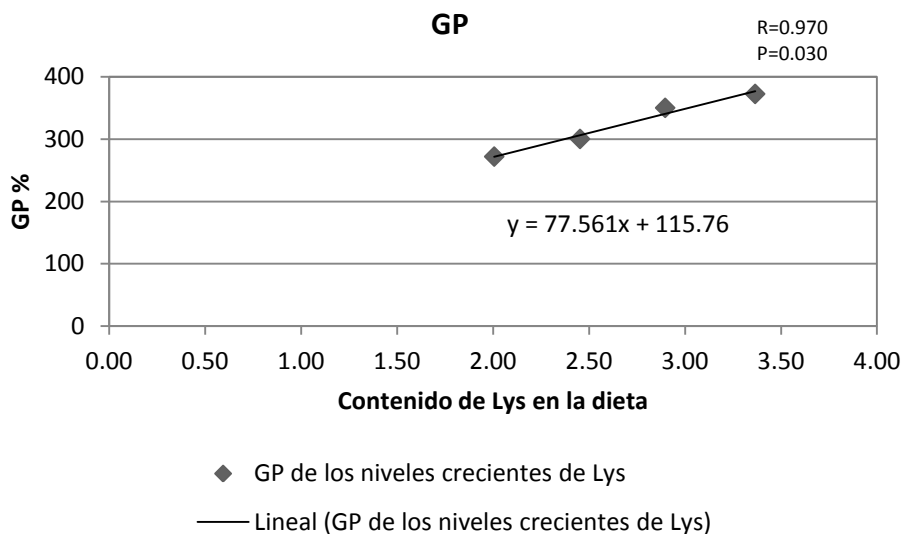


Figura 30. Correlación de la GP promedio de los camarones alimentados con los tratamientos con el contenido creciente de Lys analizada (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días. R es el coeficiente de correlación y P es la probabilidad de la pendiente.

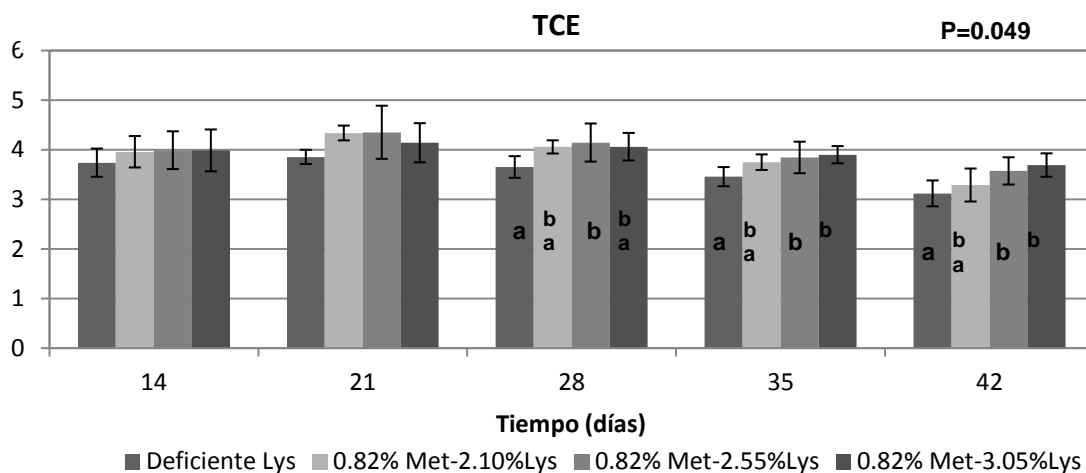


Figura 31. TCE promedio (n=4) de los camarones que consumieron las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 14-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$).

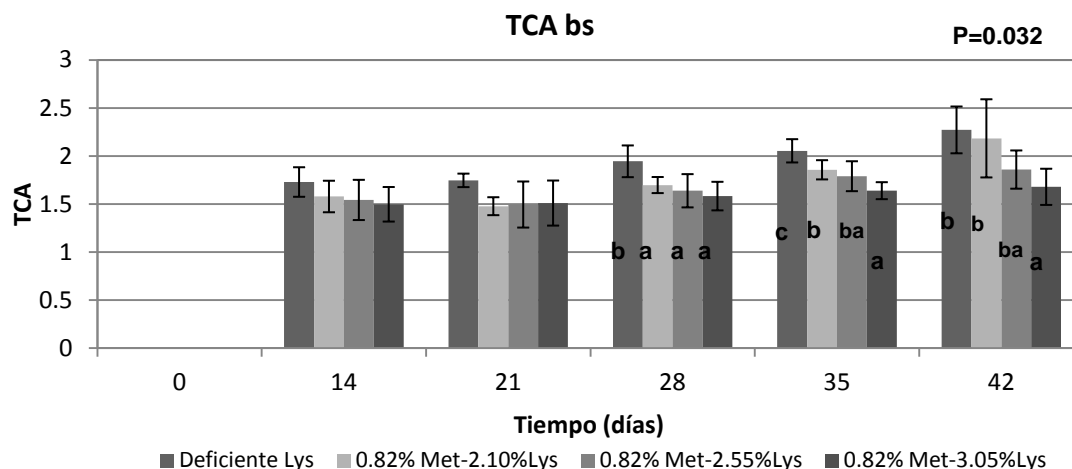


Figura 32. TCA promedio (alimento consumido bs/incremento en peso, n=4) producido con las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$).

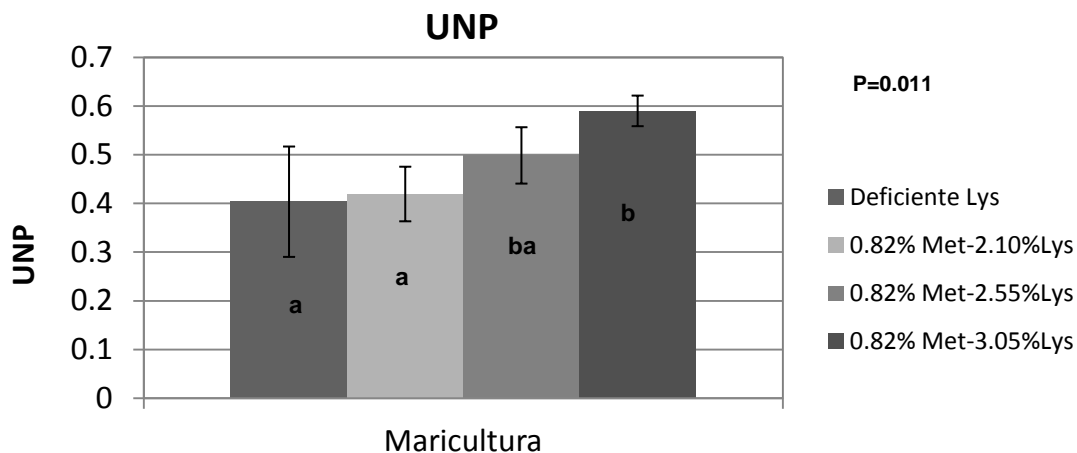


Figura 33. UNP promedio (calculada en base a los análisis proximales de maricultura, n=4) de las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$).

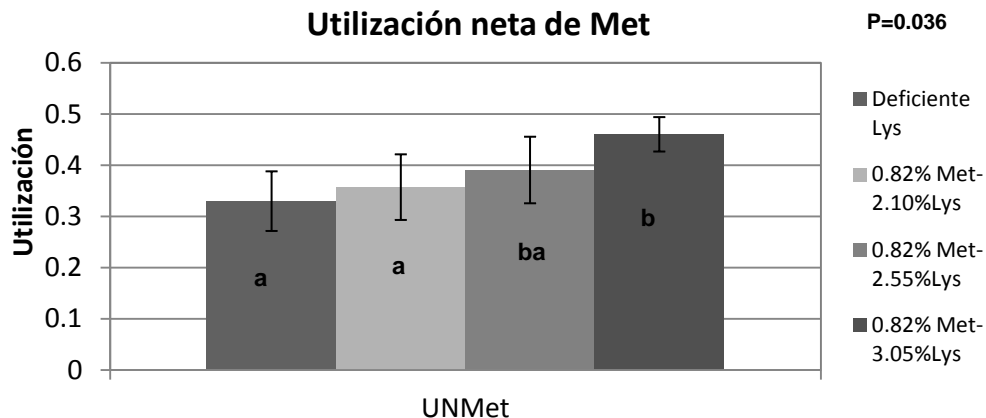


Figura 34. UNMet promedio (n=4) de las dietas con dosis creciente de Lys-HCl (0, 0.45, 0.90 y 1.35% de la dieta), de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 42 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha= 0.05$).

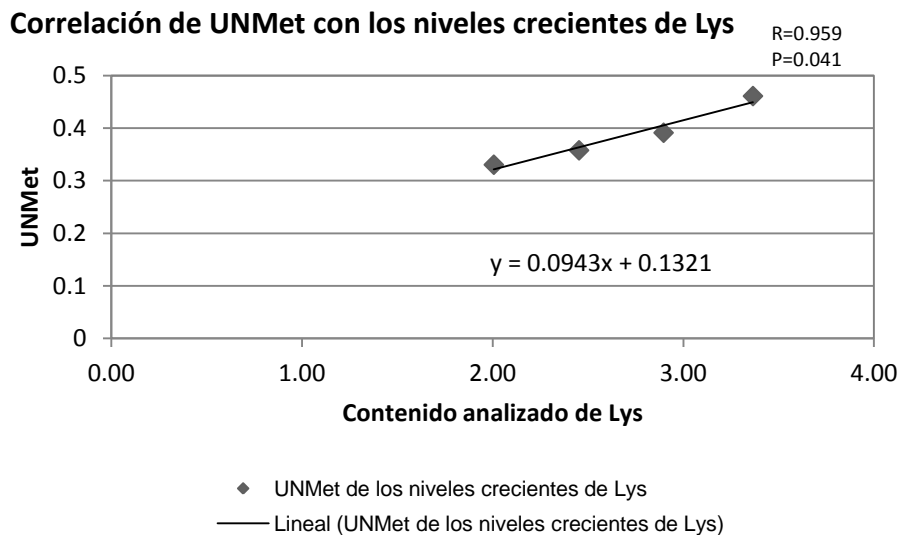


Figura 35. Correlación de la UNMet promedio de los camarones alimentados con los tratamientos con el contenido creciente de Lys analizada (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días. R es el coeficiente de correlación y P es la probabilidad de la pendiente.

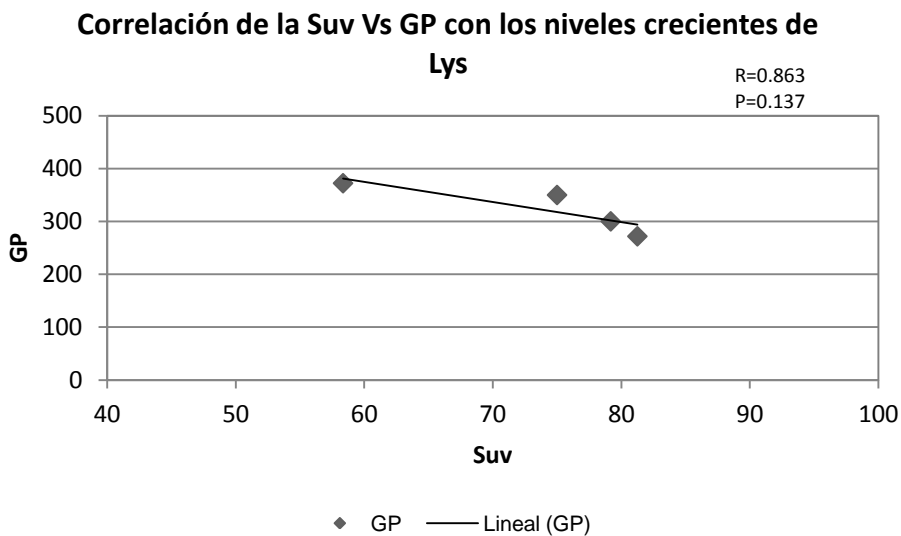


Figura 36. Correlación de la Suv con la GP con el contenido de Lys (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días. R es el coeficiente de correlación y P es la probabilidad de la pendiente.

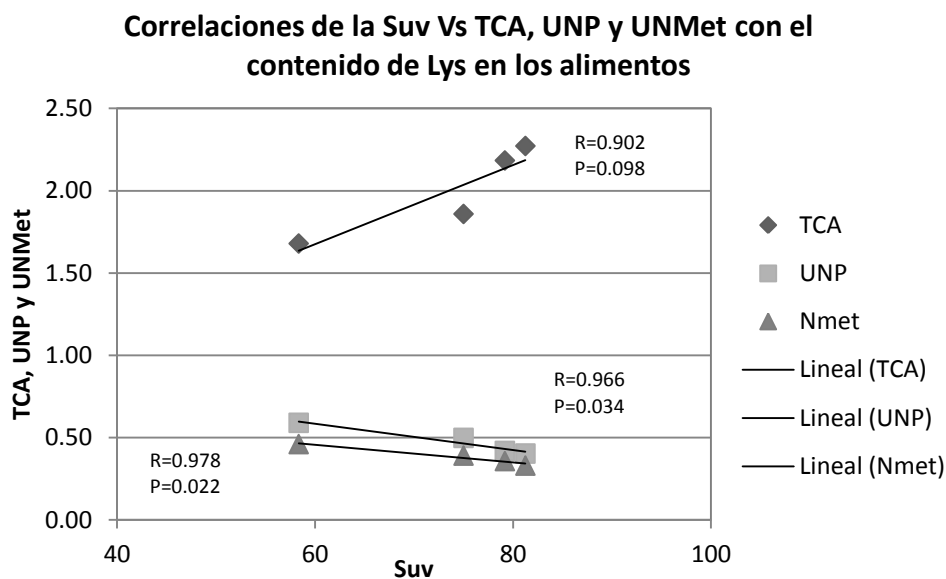


Figura 37. Correlaciones de la Suv vs. TCA, UNP y UNMet utilizando los tratamientos con el contenido creciente de Lys (2.0, 2.45, 2.90 y 3.37% de la dieta) a los 42 días. R es el coeficiente de correlación y P es la probabilidad de la pendiente.

6.6 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta

(Experimento 6)

La fabricación de las dietas a base de chícharo presentó la dificultad de que con el exceso de agua se forma una masa muy pegajosa que no circula bien por el sistema de alimentación del molino cárnico para ser extruida. Las dietas del experimento 6 formuladas para aportar alrededor de 0.4% de Met (1.25% de PC) mostraron un contenido semejante de PC (31.5-32%) y de energía (4.5-4.7 Kcal/g). Los lípidos fueron de 10% para las dietas de chícharo amarillo, pero de 8.8% para la de chícharo verde. Las variaciones más importantes se encontraron en la humedad (7.4-10%), cenizas (4.7-8.8%) y fibra+ELN (39.8-44.5%). La composición de las dietas se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Composición proximal (base húmeda) de los alimentos deficiente en Met con variación en el contenido de lupino, chícharo amarillo y verde (experimento 6).

Nutrientes (%)	Deficiente Chícharo Amarillo 1	Deficiente Chícharo Amarillo 2	Deficiente Chícharo verde 1
Humedad	9.00	7.40	10.0
Proteína	32.4	31.5	32.0
Lípidos	10.0	10.6	8.80
Ceniza	8.80	7.90	4.70
Fibra + ELN	39.8	42.6	44.5
Energía (Kcal/g)	4.50	4.40	4.70
Contenido teórico en base a los AA encontrados en los ingredientes			
Met	0.40	0.40	0.40
Lys	2.12	2.24	2.00
Arg	2.43	2.75	2.30

Los cambios en la formulación utilizada para Degussa, incluyendo la eliminación de Lupino mejoraron significativamente la estabilidad en el agua, disminuyendo la PMS (P=0.020) de 15 a 13%, sin causar cambios significativos en la ABS (P=0.090) (tabla 30).

Sin embargo, al comparar los resultados de PMS (3.6%) reportados en el informe de Degussa con los encontrados en esta evaluación, se observó una PMS 4 veces mayor.

Los cambios en la formulación de chícharo amarillo a chícharo verde no afectaron significativamente en la ABS ($P=0.460$), ni la estabilidad de los alimentos en el agua, presentado PMS ($P=0.403$) de 13% (Tabla 30).

Tabla 30. Comparaciones de la ABS y PMS entre las dietas deficientes de chícharo amarillo 1 y 2 y entre la dieta deficiente de chícharo amarillo 2 y la de chícharo verde 1.

	Deficiente Chícharo Amarillo 1		Deficiente Chícharo Amarillo 2		T- student P=	Deficiente Chícharo Amarillo 2		Deficiente Chícharo verde 1		T- student P=
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
ABS	129	24.0	144	8.00	0.090	130	15.1	138	5.86	0.460
PMS	15.3	1.93	13.2	1.42	0.020	13.1	1.09	13.8	0.69	0.403

P es la probabilidad de la prueba de T-student al comparar los tratamientos ($\alpha= 0.05$).

6.7 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya

evaluado en acuarios (Experimento 7)

6.7.1 Análisis químico de las dietas

El contenido proximal promedio de las dietas experimentales fue de 34 % de PC, 7.5% de lípidos, 6.5% de ceniza y 10% de humedad, resultando ligeramente mayor en PC (32%), lípidos (8.8%) y menor en cenizas (4.7%) con respecto a los valores esperados (Figura 38 y Tabla 31). Por otra parte la dieta comercial contra la cual se compararon, presentó valores semejantes en PC y en lípidos (33.2% y 7.3%). Las dietas resultaron significativamente diferentes en humedad ($P<0.001$) lípidos ($P=0.005$), ceniza ($P<0.001$) y humedad; el contenido de humedad varió de 8.9 a 10.6 %, los lípidos de 7.12 a 7.86 y el de cenizas de 6.45 a 6.93.

El perfil teórico y analizado de AA de las dietas en base húmeda se presenta en la Tabla 31, el análisis efectuado por Degussa arrojó valores semejantes a los esperados en Met y Lys, pero un poco superiores en el caso de Arg. Las dietas con dosis crecientes DL-Met libre presentaron 0.42, 0.47, 0.52, 0.60 y 0.80% de Met mientras el resto de los AA permanecieron sin cambios importantes. Las diferencias con respecto a la dieta control correspondieron con los niveles suplementados. La dieta comercial mostró valores mayores de Met (0.79%) y Lys (2.13%), pero inferiores en Arg (1.89%) con respecto a la dieta de base. Las diferencias en el contenido de AA de los alimentos se pierden por lixiviación a partir de los primeros 15 minutos de inmersión en el agua, quedando valores de 0.37 a 0.44% de Met en las dietas experimentales y de 0.71% en la dieta comercial, mientras que el resto de los AA se lixiviaron muy poco (Figuras 39 y 40).

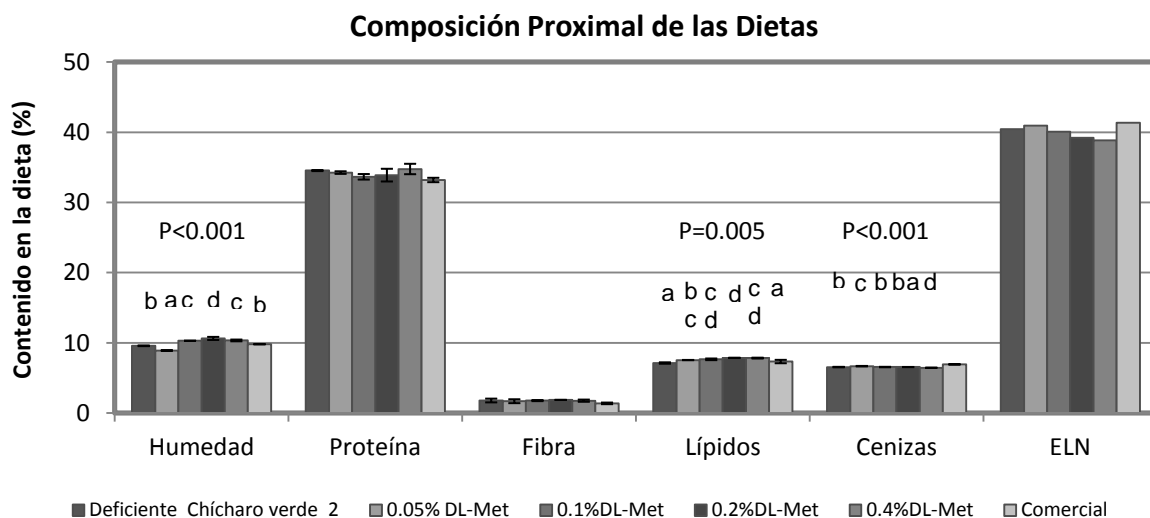


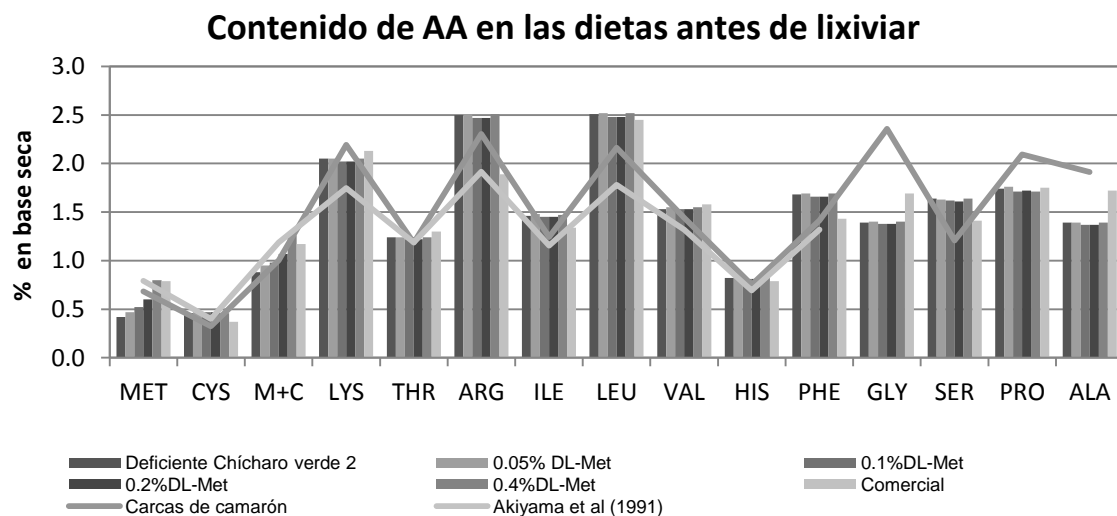
Figura 38. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 7. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntas homogéneas definidas por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Tabla 31. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 15 minutos de inmersión en agua del experimento 7.

Nutrientes (%)	Deficiente Chicharo												ANOVA P=						
	verde 2		0.05% DL-Met		0.1%DL-Met		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		Comercial								
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS							
Humedad	9.58	0.05	b	8.91	0.02	a	10.3	0.01	c	10.6	0.22	d	10.3	0.13	c	9.8	0.03	d	<0.001
Proteína	34.5	0.08		34.3	0.19		33.7	0.39		33.9	0.9		34.8	0.74		33.2	0.31		0.152
Lípidos	7.12	0.1	a	7.55	0.02	bc	7.65	0.12	cd	7.86	0.03	d	7.83	0.06	cd	7.33	0.24	ab	0.005
Ceniza	6.55	0.03	b	6.67	0.03	c	6.55	0.03	b	6.55	0.01	b	6.45	0.02	a	6.93	0.03	d	<0.001
Fibra	1.79	0.27		1.68	0.28		1.77	0.08		1.87	0.01		1.76	0.16		1.38	0.11		0.236
ELN	40.4			40.9			40.1			39.2			38.9			41.4			
Contenido total teórico de Met	0.41			0.46			0.51			0.61			0.81			0.7			
Contenido total teórico de Cys	0.47			0.47			0.47			0.47			0.47			0.35			
Contenido total teórico de Lys	2.02			2.02			2.02			2.02			2.02			2.08			
Contenido total teórico de Arg	2.32			2.32			2.32			2.32			2.32			1.91			
Relación Lys/Met	4.93			4.39			3.96			3.31			2.49			2.97			
Contenido analizado de Met	0.42			0.47			0.52			0.6			0.8			0.79			
Contenido analizado de Cys	0.46			0.47			0.47			0.47			0.46			0.37			
Contenido analizado de Lys	2.05			2.05			2.02			2.02			2.05			2.13			
Contenido analizado de Arg	2.5			2.51			2.47			2.47			2.51			1.89			
Relación Lys/Met	4.88			4.36			3.88			3.37			2.56			2.7			
Contenido de Met después de lixiviar	0.37			0.36			0.36			0.38			0.44			0.71			
Contenido de Cys después de lixiviar	0.48			0.47			0.47			0.47			0.48			0.37			
Contenido de Lys después de lixiviar	1.75			1.65			1.55			1.55			1.67			1.72			
Contenido de Arg después de lixiviar	2.39			2.32			2.27			2.29			2.36			1.8			
Relación Lys/Met	4.73			4.58			4.31			4.08			3.8			2.42			

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

A)



B)

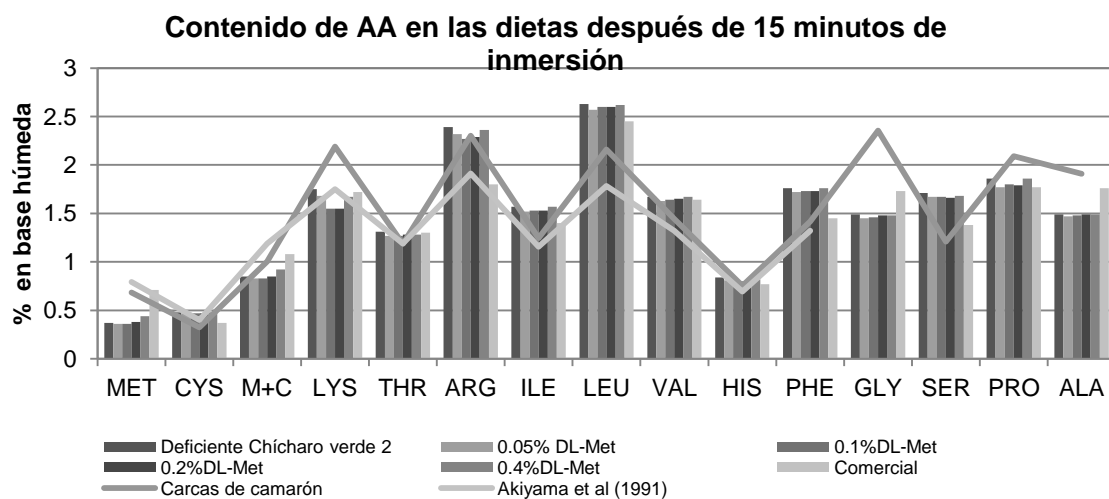


Figura 39. Contenido de AA en las dietas (A) antes y (B) después de 15 minutos de inmersión (% en base seca).

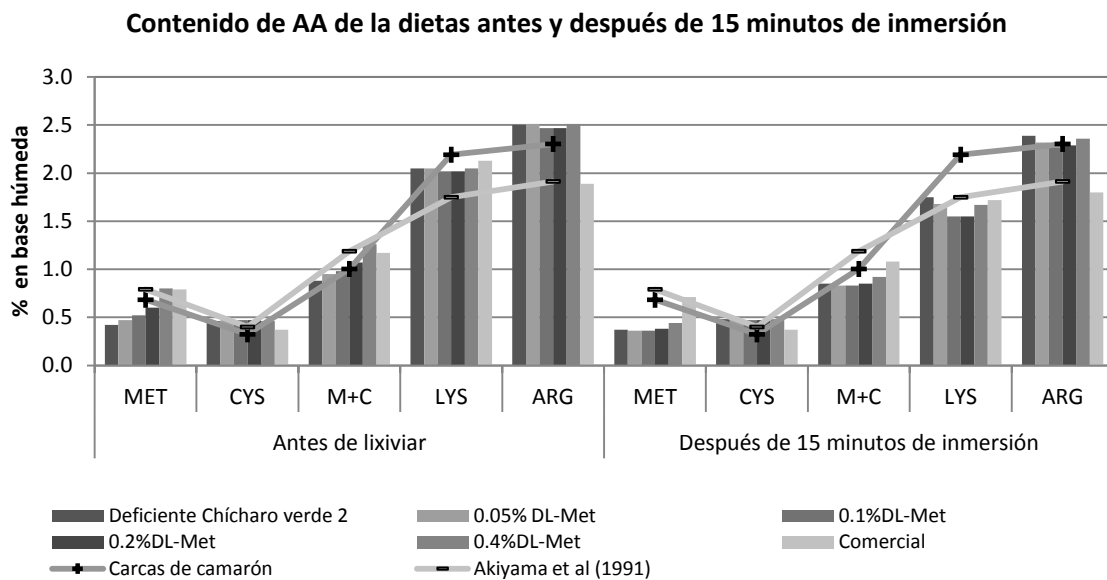


Figura 40. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 15 minutos de inmersión en agua (% en base seca).

6.7.2 Análisis físico de las dietas

6.7.2.1 Capacidad de absorción de Agua

Los análisis físicos de las dietas mostraron diferencias significativas en la ABS a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión ($P < 0.001$) en la Tabla 32, donde la dieta comercial presentó los valores significativamente más bajos de ABS (34, 44 y 64%, en cada tiempo de inmersión) que las dietas experimentales (70-91%, 103-112% y 106-131%, respectivamente). Por otra parte se observó que la ABS se incrementa con respecto al tiempo que la dieta pasa inmersa en el agua Figura 41.

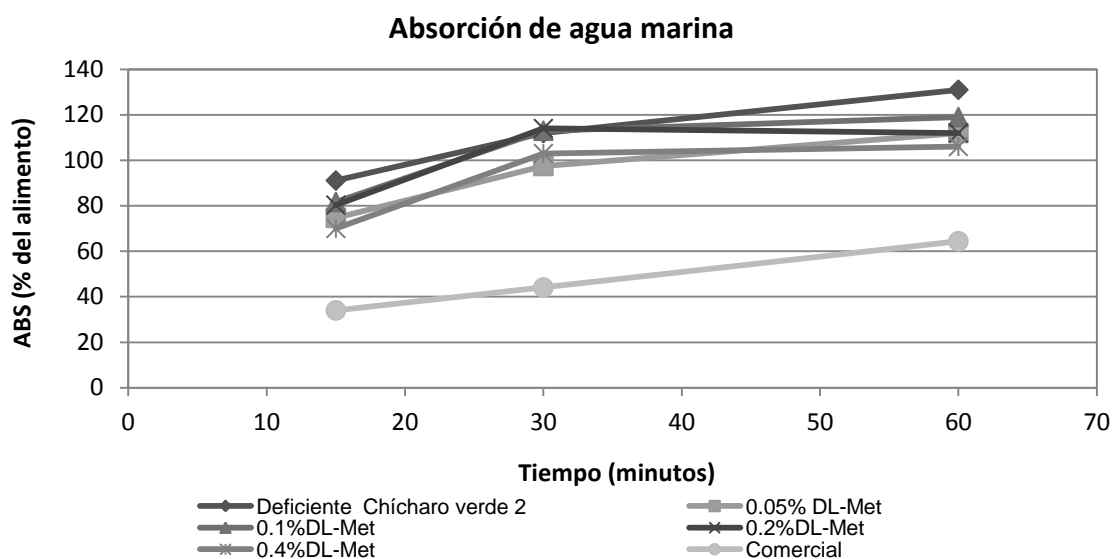


Figura 41. Cinética de ABS de agua de los alimentos del experimento 7.

6.7.2.2 Estabilidad de las dietas en el agua

6.7.2.2.1 Pérdida de materia seca

La PMS de los alimentos experimentales fueron muy semejantes a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en agua (6.2-7.3%, 9.2-9.8% y 13-14%), los cuales fueron significativamente superiores ($P < 0.001$) a los valores encontrados para la dieta comercial de 2.1, 3.1 y 3.98%, durante los respectivos tiempos de inmersión (Figura 42).

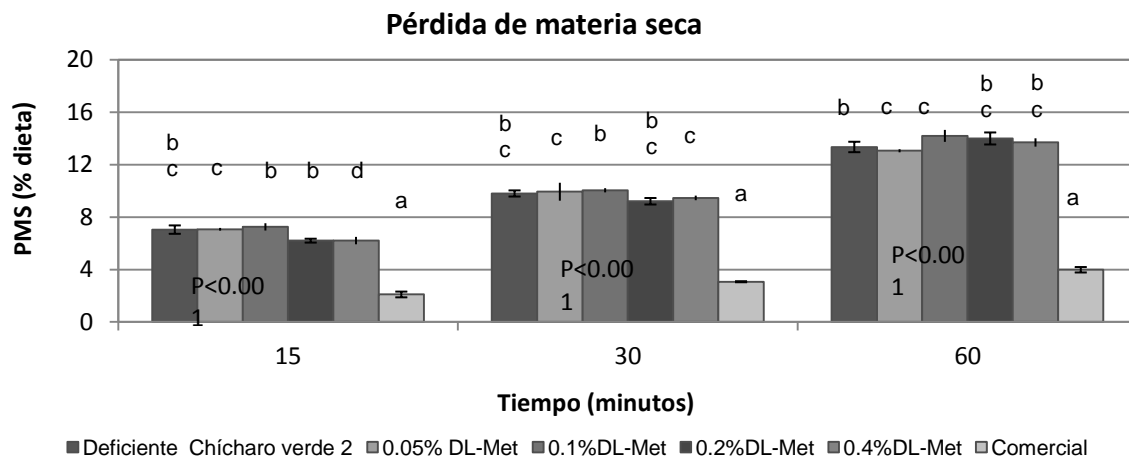


Figura 42. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 7 a los 15, 30 y 60 minutos. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha = 0.05$).

La cinética de PMS de los alimentos presenta la pérdida más importante dentro de los primeros 15 minutos como se aprecia en la Figura 43, sin embargo se muestra una pérdida casi igual de importante entre los 15 y 60 minutos. Aunque los valores de PMS en las dietas experimentales son mayores que el encontrado en la dieta comercial, existe una proporcionalidad que se conserva entre los dos tipos de dietas a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión.

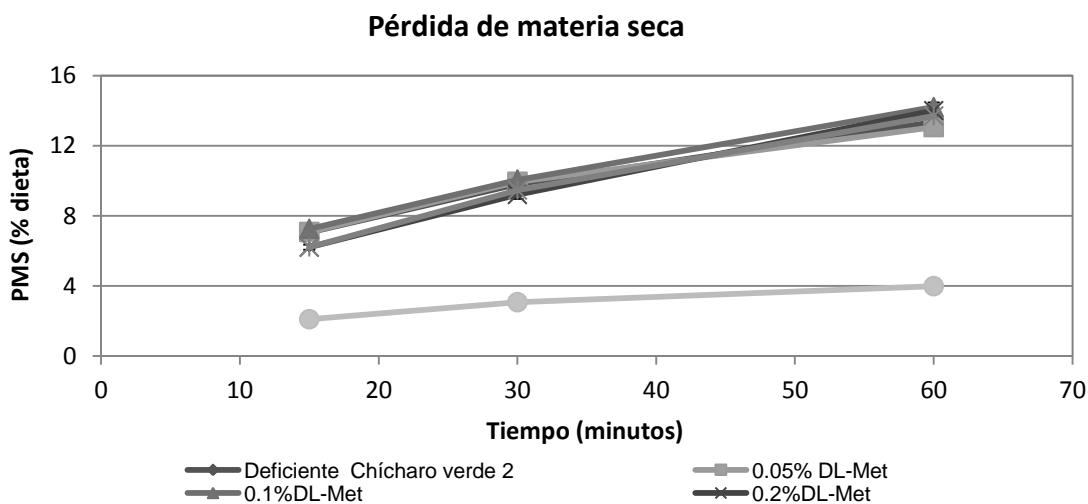


Figura 43. Cinética de pérdida de materia seca en los alimentos del experimento 7.

6.7.2.2.2 Pérdida de proteína

Las dietas no presentaron diferencias significativas en la PPC a los 15 minutos inmersión ($P=0.278$) pero si a los 30 ($P=0.036$) y 60 minutos ($P=0.016$). A los 30 minutos la PPC fue menor con la dieta deficiente (13%) que con el resto (16-19%) y mientras a los 60 minutos la PPC fue menor con la dieta comercial (10%) que con las dietas experimentales (16-17%) (Figura44). La PPC no se asoció con la PMS. La PPC mas importante en los alimentos se dio en los primeros 15 minutos, sin embargo a diferencia de la PMS, entre los 15 y 60 minutos apenas se observó un ligero incremento en la PPC con las dietas adicionadas con DL-Met, la PPC en la dieta control deficiente se conservó y por el contrario hubo una disminución abrupta en la PPC para la dieta comercial a entre los 30 y 60 minutos (Figura 45).

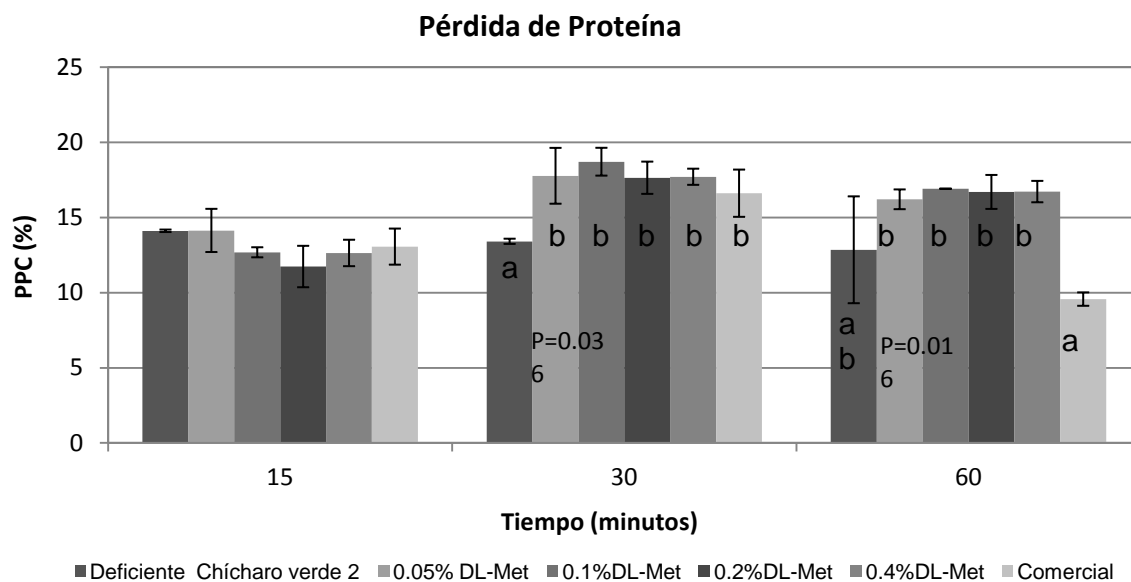


Figura 44. Comparación de pérdida de proteína (% bs) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en el agua. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

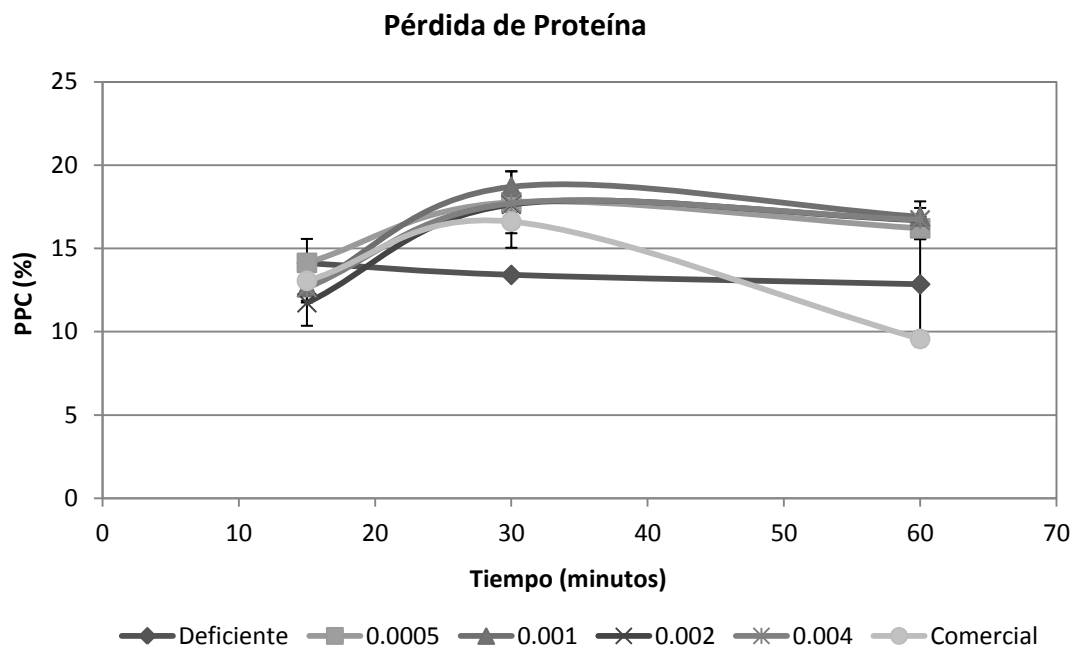


Figura 45. Cinéticas de la pérdida de proteína (% bs).

Tabla 32. ABS, PMS y PPC a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en los alimentos del experimento 7.

		Deficiente														ANOVA General P				
		Chícharo verde 2		0.05% DL-Met		0.1%DL-Met		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		Comercial		P						
		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS							
ABS	15minutos	91.1	14.6	c	74.7	6.18	b	81.7	5.35	bc	80.3	4.34	bc	70.0	0.59	b	34.0	1.35	a	<0.001
	30minutos	112	3.63	c	97.5	2.07	c	113	2.93	cd	114	8.90	b	103	6.24	b	44.1	0.58	a	<0.001
	60minutos	131	14.3	c	112	1.77	bc	119	13.5	bc	112	15.0	b	106	1.81	b	64.4	2.00	a	<0.001
PMS	15minutos	7.05	0.32	c	7.25	0.28	c	6.21	0.15	b	6.21	0.28	b	7.07	0.10	c	2.10	0.22	a	<0.001
	30minutos	9.81	0.23	bc	10.0	0.16	c	9.21	0.25	b	9.47	0.18	bc	9.94	0.68	c	3.07	0.04	a	<0.001
	60minutos	13.4	0.40	bc	14.2	0.46	cd	14.0	0.46	cd	13.7	0.32	bcd	13.1	0.12	b	3.98	0.21	a	<0.001
PPC	15minutos	14.1	0.08		14.1	1.44		12.7	0.33		11.7	1.38		12.6	0.88		13.1	1.20		0.278
	30minutos	13.4	0.17	a	17.8	1.86	b	18.7	0.93	b	17.6	1.07	b	17.7	0.54	b	16.6	1.57	b	0.036
	60minutos	12.9	3.55	ab	16.2	0.66	b	16.9	0.00	b	16.7	1.13	b	16.7	0.71	b	9.57	0.45	a	0.016

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha= 0.05$).

6.7.2.2.3 Pérdida de aminoácidos

Las dietas experimentales después de ser lixiviadas perdieron sus diferencias en el contenido de Met desde los 15 minutos de inmersión, presentando un contenido de 0.37% de Met total, mientras los valores de Cys, Lys y Arg fueron de 0.48, 1.60 y 2.30%. La dieta comercial arrojó contenidos de 0.71, 0.37, 1.72 y 1.8% para Met, Cys, Lys y Arg respectivamente. Cuando se consideran los contenidos después de lixiviar sus proporciones Lys/Met fueron de 4.95 para la dieta deficiente, 4.79, 4.81, 4.5 y 4.26 para las dietas suplementadas con DL-Met y 2.57 para la comercial.

Las PAA solo fueron cuantificadas a los 60 minutos, debido a que no se obtuvo la humedad de las muestras analizadas a los 15 y 30 minutos. La PAA fue mayor en la dieta deficiente (19% de Met, 18% de Lys y 17% de Arg) que en la dieta comercial (10% de Met, 15% de Lys y 10% de Arg), “aun cuando estás están constituidas de proteínas integrales” (Tabla 33 y Figura 46). Las dietas adicionadas con DL-Met (0.5, 0.1, 0.2 y 0.4%) tuvieron pérdidas de 26, 34, 40 y 52% de la Met total. La PMet libre fue casi completa (90%) en las dietas suplementadas con 0.1, 0.2 y 0.4% de DL-Met; en el caso de la dieta suplementada con 0.05% de DL-Met el contenido del AA libre después de ser lixiviada fue inferior al rango de lectura, que se puede considerar una PMet libre del 100%. La PCys varió ampliamente desde 7.8% en la dieta suplementada con 0.4% de DL-Met hasta 15.3% con la dieta suplementada con 0.1% de DL-Met, mientras las PLys y PArg fueron del orden de 19 y 18% respectivamente.

Tabla 33. Porcentaje de PMet total, PMet libre, PLys total, PArg y PCys a los 60 minutos de inmersión en el agua, en los alimentos del experimento 7.

	Deficiente Chícharo verde 2	0.05% DL-Met	0.1%DL- Met	0.2%DL- Met	0.4%DL- Met	Comercial
Met	19.0	26.4	34.4	40.2	52.2	10.6
Met Libre	--	100	87.6	89.9	91.8	--
Lys	18.2	19.3	18.8	20.0	20.5	14.8
Arg	17.3	18.6	18.8	18.8	17.2	7.30
Cys	9.78	14.2	15.3	15.0	7.80	8.30

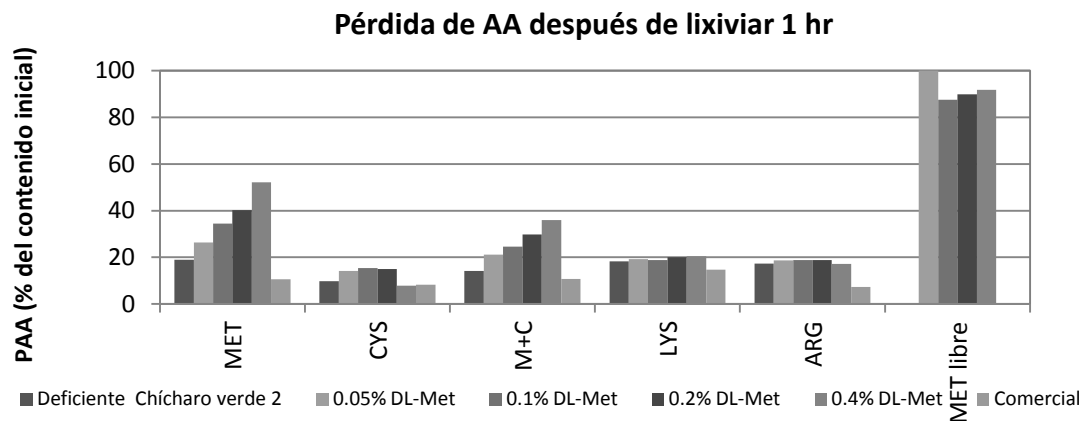


Figura 46. Porcentaje de PMet total, PCys, PMet+Cys, PLys, PArg y PMet libre a los 60 minutos de inmersión en el agua, en los alimentos del experimento 7.

6.7.3 Resultados zootécnicos

La baja Suv (60%) observada en algunos de los acuarios de los distintos tratamientos asociada con canibalismo, obligó a detener el bioensayo a los 14 días (Figura 47 y Tabla 34). La variabilidad en la respuesta de los replicados no permitió definir diferencias significativas en la Suv ($P=0.859$) de los camarones alimentados con los diferentes tratamientos, incluido el control externo comercial. Los parámetros de crecimiento (Peso, GP y TCE) biomasa y TCA tampoco mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 34).

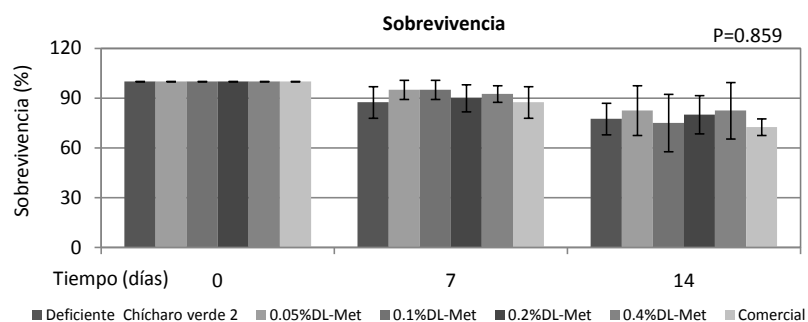


Figura 47. Sobrevivencia (10 animales iniciales) de todos los tratamientos, de 0-14 días. Deficiente en Met-Lys (0.42% de Met y 2.05% de Lys). P es la probabilidad de Anova a los 14 días. Las barras indican la desviación estándar.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en el consumo (expresado en base húmeda, base seca y corregido por lixiviación, $P < 0.001$) y TEP ($P < 0.032$). En la Figura 48 se observa que el consumo con la dieta comercial expresado en base húmeda (0.78g/individuo), base seca (0.70g/individuo) y corregido por lixiviación (0.69g/individuo) fue menor que con las dietas experimentales (0.86-0.87, 0.78-0.80 y 0.73-0.74 g/individuo, respectivamente). Por el contrario la TEP fue mayor con la dieta comercial (2.0) que con las dietas experimentales (Figura 49).

La suplementación de la dieta deficiente con niveles crecientes de DL-Met (0.05, 0.1, 0.2 y 0.4%) durante el bioensayo de crecimiento no produjo diferencias significativas en los parámetros zootécnicos salvo por un mayor consumo en base seca de la dieta con 0.4% de DL-Met, el cual se ve opacado en la TCA (Tabla 35).

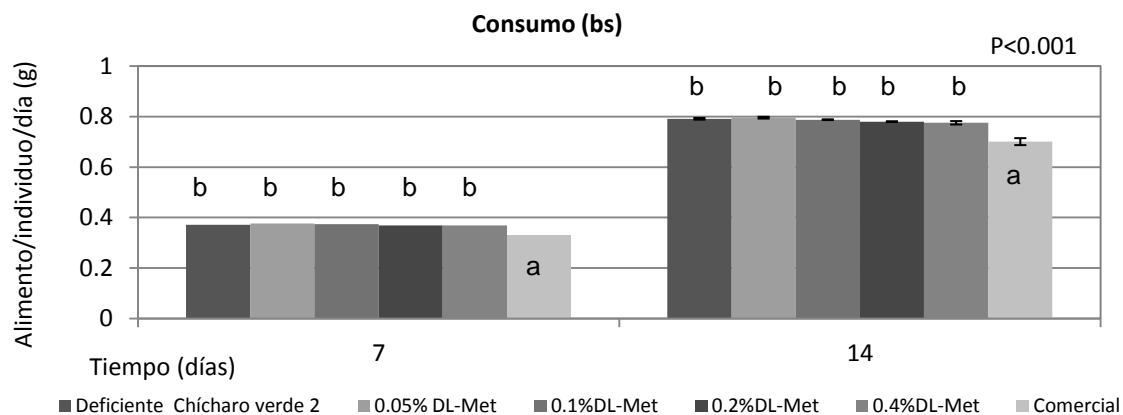


Figura 48. Consumo promedio por individuo (% en base seca). P es la probabilidad de Anova a los 14 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha = 0.05$).

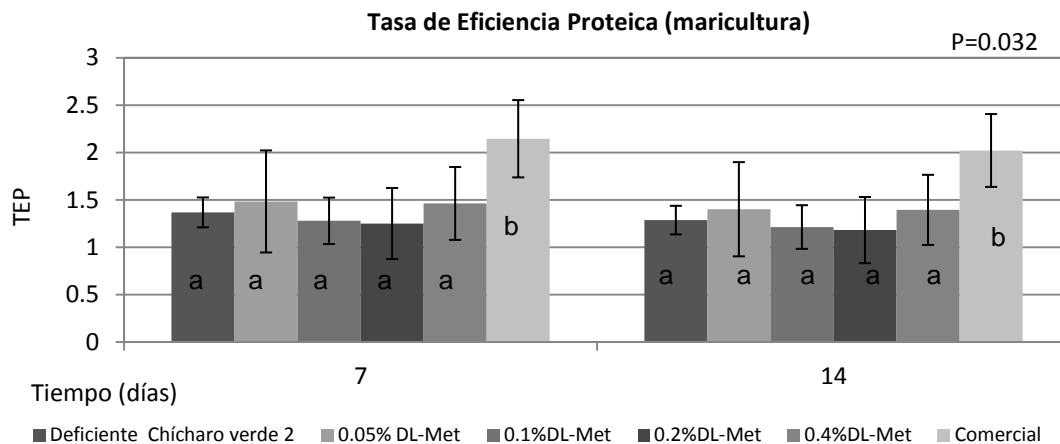


Figura 49. TEP promedio calculada en base a los análisis proximales realizados por maricultura para todos los tratamientos, a los 14 días de experimentación. P es la probabilidad de Anova a los 14 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Tabla 34. Resultados zootécnicos a los 14 días de experimentación entre las dietas experimentales y la dieta comercial del bioensayo del experimento 7.

Dia14	Deficiente														ANOVA General P				
	Chícharo verde 2		0.05% DL-Met		0.1%DL-Met		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		Comercial		P						
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS							
Peso	0.99	0.05	1.02	0.15	0.96	0.07	0.95	0.11	1.02	0.11	1.12	0.10	0.258						
Gpeso	65.0	7.70	59.8	11.4	58.5	17.5	70.2	18.3	70.0	25.2	87.3	17.6	0.266						
TCE	3.57	0.33	3.33	0.51	3.26	0.80	3.77	0.76	3.73	1.05	4.46	0.67	0.243						
Suv	77.5	9.57	75.0	17.32	80.0	11.55	82.5	17.08	82.5	15.0	72.5	5.0	0.859						
Biomasa	6.14	0.60	5.82	1.24	6.15	0.63	6.60	1.16	6.65	1.04	6.24	0.70	0.810						
Conbh	0.87	0.01	b	0.88	0.00	b	0.87	0.01	b	0.86	0.02	b	0.87	0.01	b	0.78	0.01	a	<0.001
Conbs	0.79	0.01	b	0.79	0.00	b	0.78	0.01	b	0.78	0.01	b	0.80	0.01	b	0.70	0.01	a	<0.001
Conlix	0.74	0.01	b	0.73	0.00	b	0.73	0.01	b	0.73	0.01	b	0.74	0.01	b	0.69	0.01	a	<0.001
TCAbh	2.27	0.25	2.52	0.49	2.70	0.94	2.17	0.56	2.29	0.79	1.53	0.29	0.179						
TCAbs	2.05	0.23	2.26	0.44	2.41	0.84	1.95	0.50	2.08	0.72	1.38	0.26	0.190						
TCAlix	1.91	0.21	2.09	0.41	2.26	0.79	1.83	0.47	1.94	0.67	1.35	0.26	0.253						
TEP maricultura	1.29	0.15	a	1.21	0.23	a	1.18	0.35	a	1.40	0.37	a	1.40	0.50	a	2.02	0.38	b	0.032

El peso inicial de los animales fue de 0.60 ± 0.00 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

Tabla 35. Resultados de los parámetros zootécnicos a los 14 días entre las dietas con diferentes niveles de Met en el bioensayo del experimento 7.

Dia14	Deficiente										ANOVA DL-Met P=					
	Chícharo verde 2		0.05% DL-Met		0.1%DL-Met		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met							
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS						
Peso	0.99	0.05	1.02	0.15	0.96	0.07	0.95	0.11	1.02	0.11	0.810					
Gpeso	65.0	7.7	59.8	11.4	58.5	17.5	70.2	18.3	70.0	25.2	0.795					
TCE	3.57	0.33	3.33	0.51	3.26	0.80	3.77	0.76	3.73	1.05	0.809					
Suv	77.5	9.574	75.0	17.32	80.0	11.55	82.5	17.08	82.5	15	0.932					
Biomasa	6.14	0.60	5.82	1.24	6.15	0.63	6.60	1.16	6.65	1.04	0.728					
Conbh	0.87	0.01	0.88	0.00	0.87	0.01	0.86	0.02	0.87	0.01	0.472					
Conbs	0.79	0.01	bc	0.79	0.00	abc	0.78	0.01	ab	0.78	0.01	ab	0.80	0.01	c	0.041
Conlix	0.74	0.01	0.73	0.00	0.73	0.01	0.73	0.01	0.74	0.01	0.349					
TCAbh	2.27	0.25	2.52	0.49	2.70	0.94	2.17	0.56	2.29	0.79	0.784					
TCAbs	2.05	0.23	2.26	0.44	2.41	0.84	1.95	0.50	2.08	0.72	0.812					
TCAlix	1.91	0.21	2.09	0.41	2.26	0.79	1.83	0.47	1.94	0.67	0.807					
TEPM	1.29	0.15	1.21	0.23	1.18	0.35	1.40	0.37	1.40	0.50	0.839					

El peso inicial de los animales fue de 0.60 ± 0.00 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

6.8 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya

evaluado en jaulas (Experimento 8)

6.8.1 Análisis químico de las dietas

Las dieta deficiente chícharo verde 2, aquellas suplementadas con 0.2 y 0.4% de DL-Met y la dieta comercial reportadas en el experimento 7 también fueron utilizadas en este experimento. Adicionalmente se preparó una dieta suplementada con 0.8% de DL-Met, cuyo contenido proximal corresponde con el promedio de las dietas experimentales previamente analizadas de 34% de PC, 7.5% de lípidos, 6.5% de ceniza y 10% de humedad, resultando ligeramente mayor en PC (32%) y lípidos (8.8%) pero menor en cenizas (4.7%) con respecto a los valores esperados. Por otra parte la dieta comercial contra la cual se compararon, presentó valores semejantes en PC y en lípidos (33.2% y 7.3%). Las dietas resultaron significativamente diferentes en humedad ($P=0.002$), lípidos ($P=0.004$) y ceniza ($P<0.001$; el contenido de humedad varió de 9.58 a 10.6 %, los lípidos de 7.12 a 7.86 y el de cenizas de 6.45 a 6.93 (Figura 50 y Tabla 36).

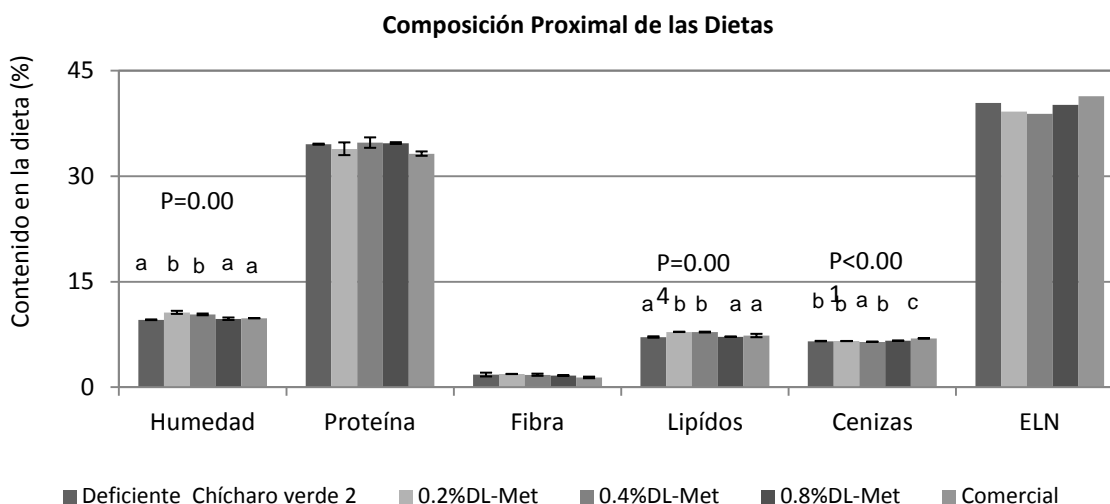
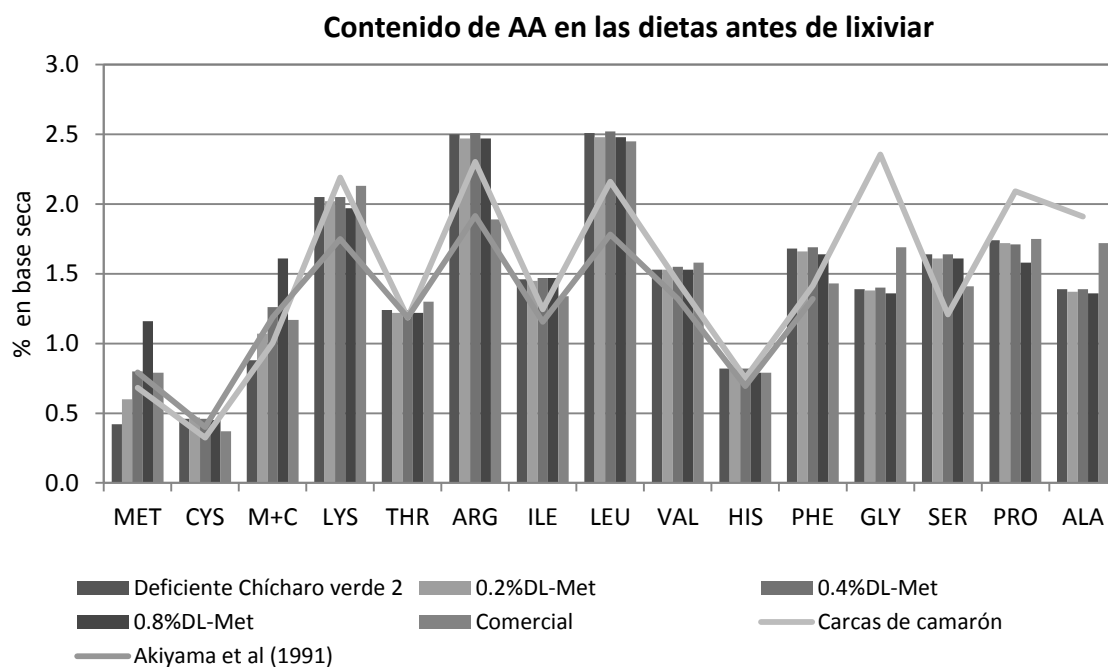


Figura 50. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 8. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

El perfil teórico y analizado de AA de las dietas en base húmeda se presenta en la Tabla 36, el análisis efectuado por Degussa arrojó valores semejantes a los esperados en Met y Lys, pero un poco superiores en el caso de Arg (Figura 51). Las dietas con dosis crecientes DL-Met libre presentaron 0.42, 0.60, 0.80 y 1.16% de Met mientras el resto de los AA permanecieron sin cambios importantes (Figura 52). Las diferencias con respecto a la dieta deficiente correspondieron con los niveles suplementados. La dieta comercial mostró valores mayores de Met (0.79%) y Lys (2.13%), pero inferiores en Arg (1.89%) con respecto a la dieta de base. Las diferencias en el contenido de AA se pierden por lixiviación a partir de los primeros 15 minutos de inmersión en el agua, quedando valores de 0.37 a 0.44% de Met en las dietas experimentales y de 0.71% en la dieta comercial, mientras que el resto de los AA se lixiviaron muy poco; excepto por un mayor decremento del contenido de Lys y Arg en la dieta suplementada con 0.8% de DL-Met (Figuras 51 y 52). La proporción relativa de Lys/Met en las dietas experimentales y la dieta comercial (1.8 a 4.9) fue muy similar relación esperada (Tabla 36)

A)



B)

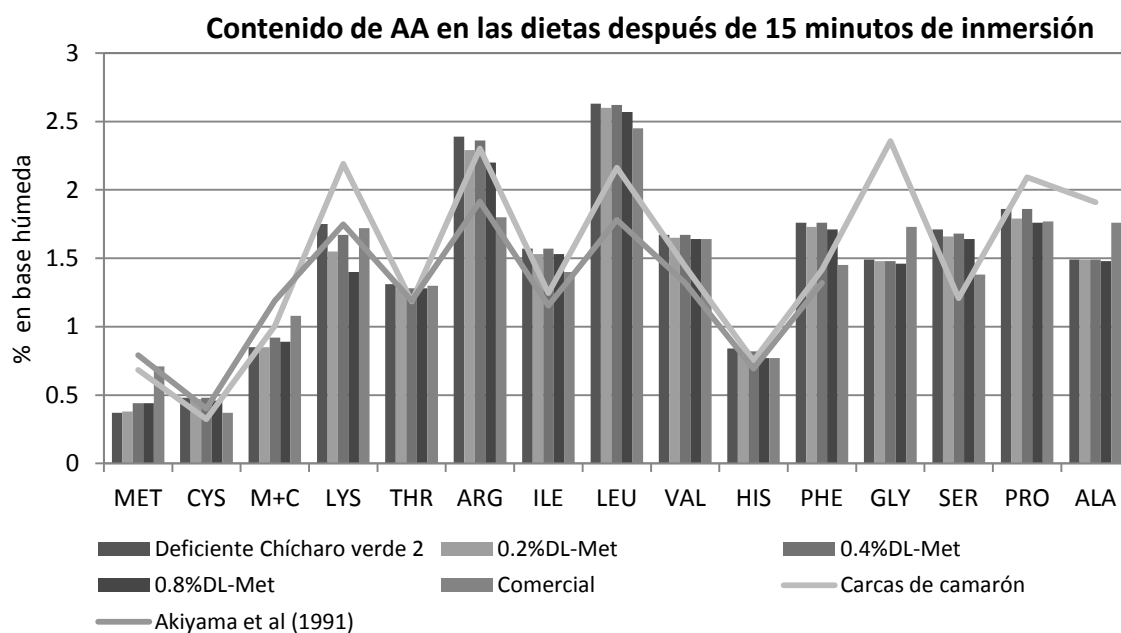


Figura 51. Contenido de AA en las dietas (A) antes y (B) después de 15 minutos de inmersión (% en base seca).

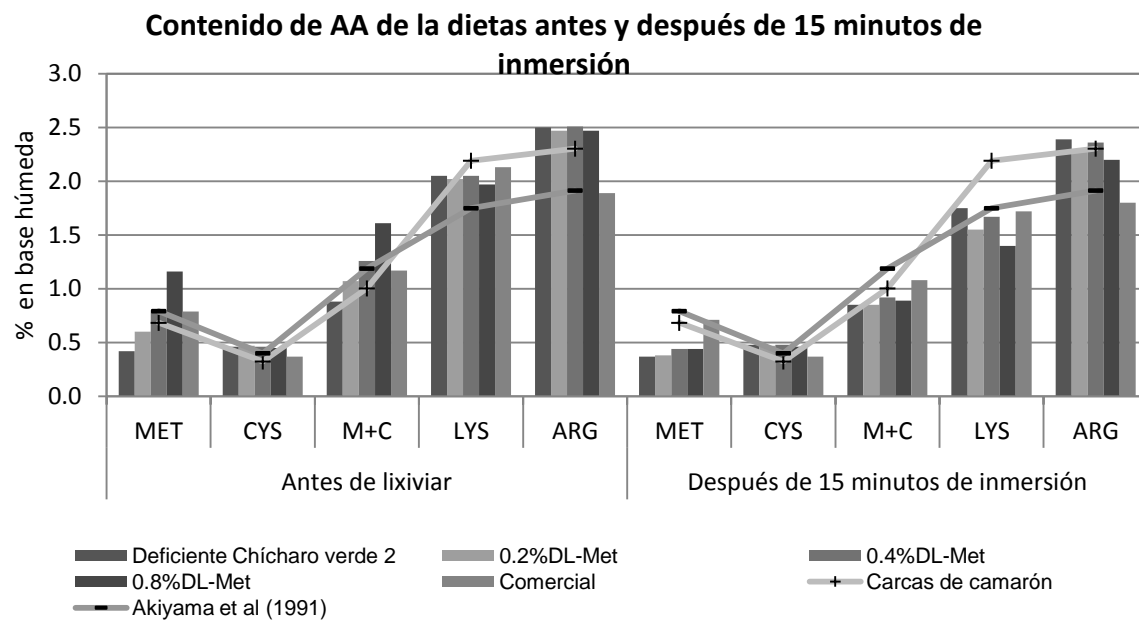


Figura 52. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 15 minutos de inmersión en agua (% en base seca).

Tabla 36. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 15 minutos de inmersión en agua del experimento 8.

Nutrientes (%)	Deficiente verde 2		Chícharo		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		0.8%DL-Met		Comercial		ANOVA P=			
	\bar{x}	DS	a	\bar{x}	DS	a	\bar{x}	DS	b	\bar{x}	DS	a				
Humedad	9.58	0.05	a	10.6	0.22	a	10.3	0.13	b	9.72	0.18	b	9.8	0.03	a	0.002
Proteína	34.5	0.08		33.9	0.9		34.8	0.74		34.7	0.12		33.2	0.31		0.131
Lípidos	7.12	0.1	a	7.86	0.03	b	7.83	0.06	b	7.17	0.01	a	7.33	0.24	a	0.004
Ceniza	6.55	0.03	b	6.55	0.01	b	6.45	0.02	a	6.6	0.02	b	6.93	0.03	c	<0.001
Fibra	1.79	0.27		1.87	0.01		1.76	0.16		1.65	0.02		1.38	0.11		0.112
ELN	40.4			39.2			38.9			40.2			41.4			
Contenido total teórico de Met	0.41			0.61			0.81			1.21			0.7			
Contenido total teórico de Cys	0.47			0.47			0.47			0.47			0.33			
Contenido total teórico de Lys	2.02			2.02			2.02			2.02			2.08			
Contenido total teórico de Arg	2.32			2.32			2.32			2.32			1.91			
Relación Lys/Met	4.93			3.31			2.49			1.67			2.97			
Contenido analizado de Met	0.42			0.6			0.81			1.16			0.79			
Contenido analizado de Cys	0.46			0.47			0.46			0.45			0.37			
Contenido analizado de Lys	2.05			2.02			2.05			2.05			1.97			
Contenido analizado de Arg	2.5			2.47			2.51			2.47			1.89			
Relación Lys/Met	4.88			3.37			2.56			1.77			2.49			
Contenido de Met después de lixiviar	0.37			0.38			0.44			0.44			0.71			
Contenido de Cys después de lixiviar	0.48			0.47			0.48			0.46			0.37			
Contenido de Lys después de lixiviar	1.75			1.55			1.67			1.4			1.72			
Contenido de Arg después de lixiviar	2.39			2.29			2.36			2.2			1.8			
Relación Lys/Met	4.73			4.08			3.8			3.18			2.42			

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

6.8.2 Análisis físico de las dietas

6.8.2.1 Capacidad de absorción de Agua

Los análisis físicos de las dietas mostraron diferencias significativas en la ABS a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión ($P < 0.001$) en la Tabla 32, donde la dieta comercial presentó los valores significativamente más bajos de ABS (34, 44 y 64%, en cada tiempo de inmersión) que las dietas experimentales (70-91%, 103-112% y 106-131%, respectivamente). Por otra parte se observó que la ABS se incrementa con respecto al tiempo que la dieta pasa inmersa en el agua (Figura 53).

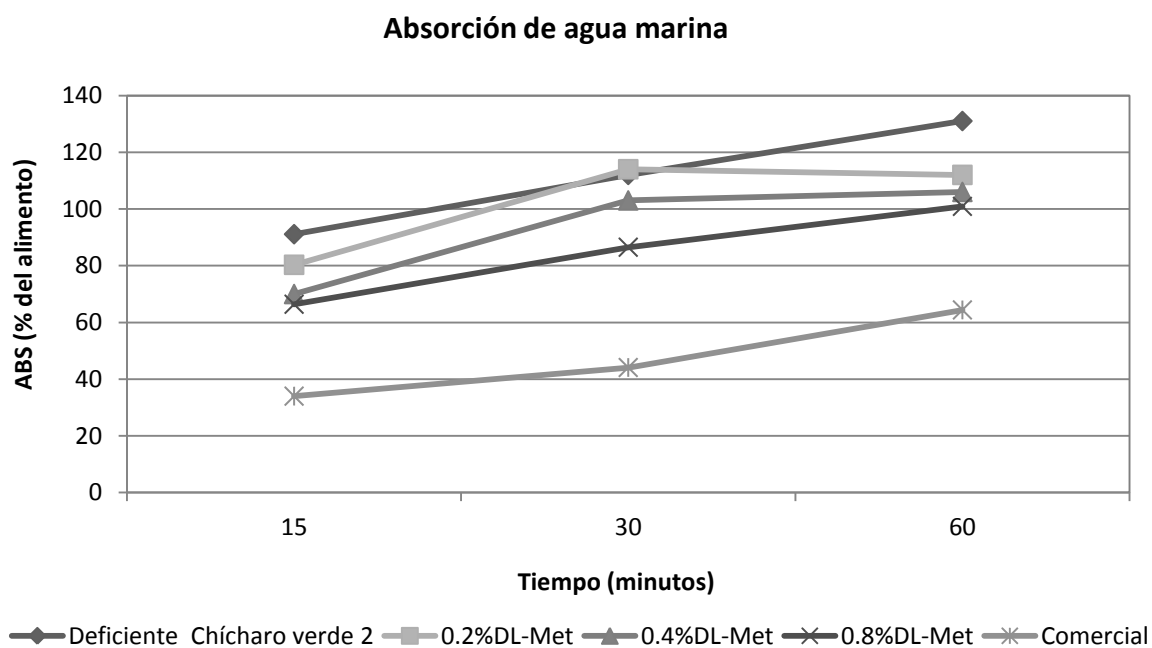


Figura 53. Cinética de ABS de agua de los alimentos del experimento 8.

6.8.2.2 Estabilidad de las dietas en el agua

6.8.2.2.1 Pérdida de materia seca

La PMS de los alimentos experimentales fueron muy semejantes a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en agua (6.2-7.3%, 9.2-9.8% y 13-14%), los cuales fueron significativamente superiores ($P < 0.001$) a los valores encontrados para la dieta comercial de 2.1, 3.1 y 3.98%, durante los respectivos tiempos de inmersión (Figura 54).

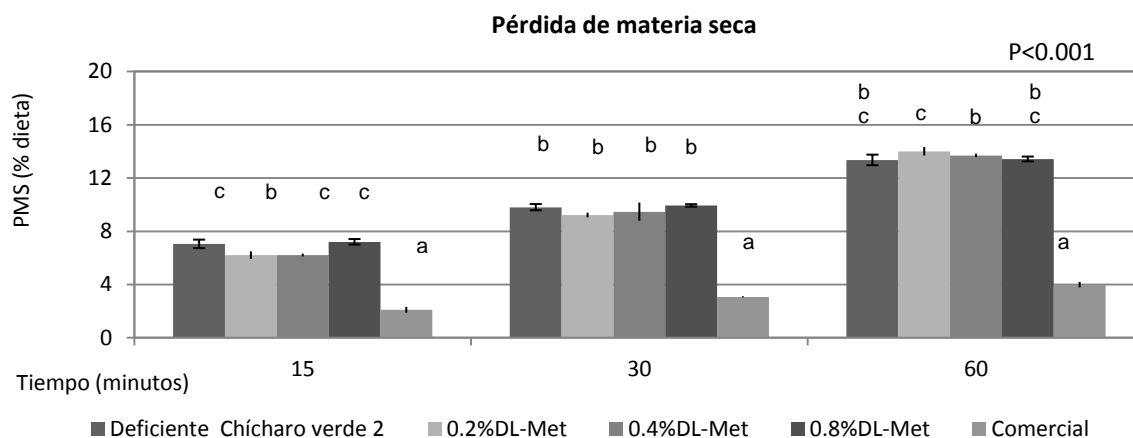


Figura 54. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 8 a los 15, 30 y 60 minutos. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntas homogéneas definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha = 0.05$).

La cinética de PMS de los alimentos presenta la pérdida más importante dentro de los primeros 15 minutos como se aprecia en la figura 43, sin embargo se muestra una pérdida casi igual de importante entre los 15 y 60 minutos. Aunque la magnitud de la PMS en la dietas experimentales es mayor que en la dieta comercial, la relación entre los valores de los dos tipos de dietas a los 15 y 60 minutos se conserva.

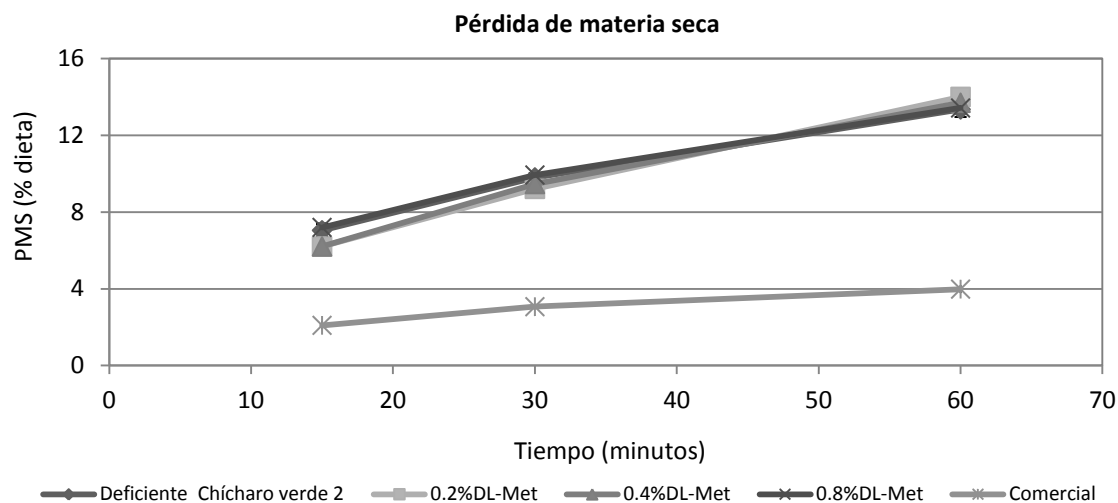


Figura 55. Cinética de pérdida de materia seca en los alimentos del experimento 8.

6.8.2.2.2 Pérdida de proteína

Las dietas no presentaron diferencias significativas en PPC a los 15 minutos de inmersión ($P=0.278$) pero si a los 30 ($P=0.036$) y 60 minutos ($P=0.016$). A los 30 minutos la PPC fue menor en la dieta deficiente (13%) que el resto (16-19%) de las dietas experimentales y mientras a los 60 minutos la PPC fue menor con la dieta comercial (10%) que con las dietas experimentales (16-17%) (Figura56). La PPC no se asoció con la PMS. La PPC más importante en los alimentos se presentaron en los primeros 15 minutos, sin embargo a diferencia de la PMS, entre los 15 y 60 minutos apenas se observó un ligero incremento en la PPC con las dietas adicionadas con DL-Met, la PPC en la dieta control deficiente se conservó y por el contrario hubo una disminución abrupta en la PPC para la dieta comercial a entre los 30 y 60 minutos (Figura 57).

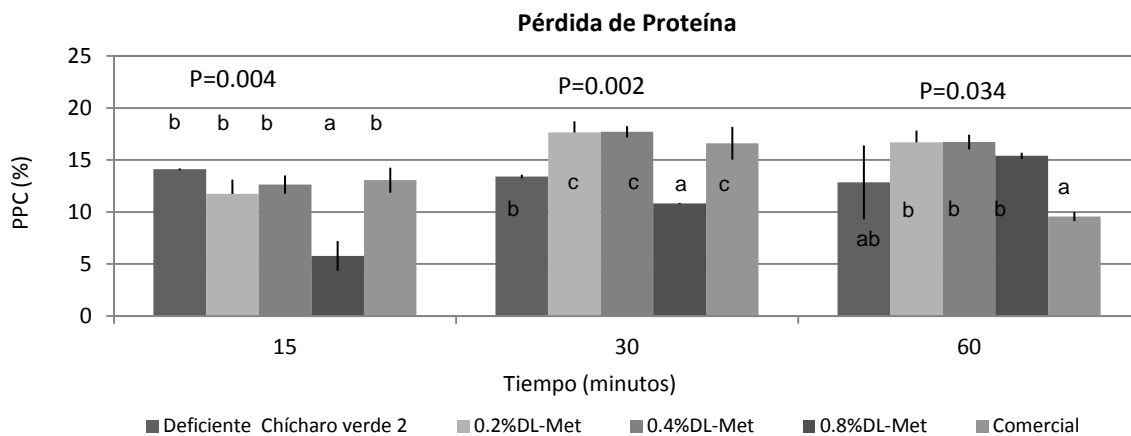


Figura 56. Comparación de pérdida de proteína (% bs) entre dietas a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en el agua. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

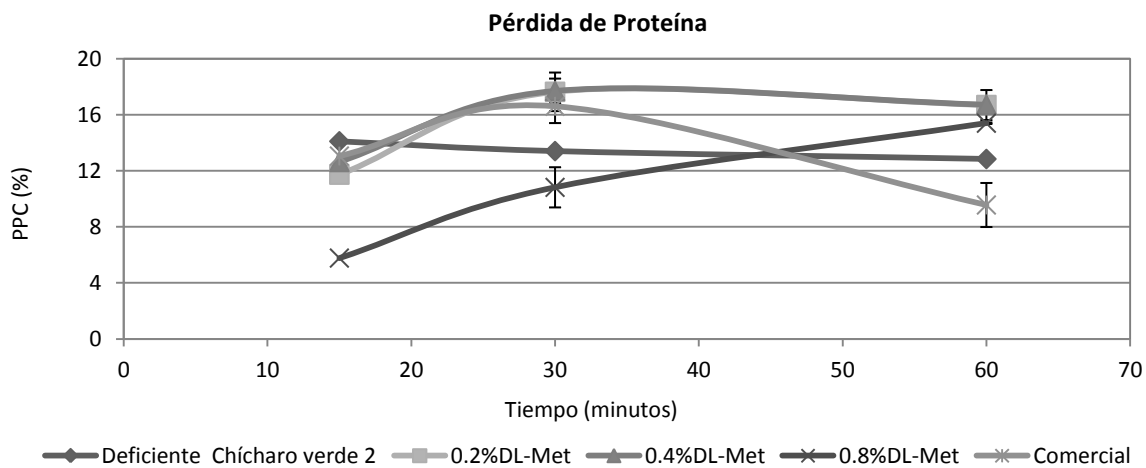


Figura 57. Cinéticas de la pérdida de proteína (% bs) del experimento 8.

Los análisis físicos de las dietas mostraron diferencias significativas a los tres tiempos de inmersión, 15, 30 y 60 minutos para ABS ($P<0.001$), PMS ($P<0.001$) y PPC ($P=0.004$, $P=0.002$ y $P=0.034$), se presentan en la Tabla 37. La dieta con menor ABS en

cada tiempo (34, 44 y 64%) fue la comercial y aquella con más ABS fue la deficiente (91,112 y 131%), el resto presentaron valores intermedios (66-80%, 86-114% y 100-112%). Se observó que la ABS de la dieta adicionada con 0.8% de Met se incrementa con el tiempo de inmersión al igual que lo encontrado en el experimento anterior con las dietas restantes. La PMS en cada tiempo de inmersión fue menor con la dieta comercial (2.1, 3.1 y 4%) que con las dietas experimentales (6.2-7.2%, 9.5-10% y 13.1-13.7%), además la PMS también se incrementó con respecto al tiempo de inmersión. La PPC a los 15 minutos de inmersión fue menor con la dieta adicionada con 0.8% de Met (5.8%) respecto del resto de las dietas incluyendo la comercial (12-14). La PPC a los 30 minutos de inmersión fue menor con la dieta adicionada con 0.8% de Met (11%), incrementándose con la dieta deficiente (13%) y teniendo la mayores PPC con las dietas restantes (17-18%). La PPC a los 60 minutos modificó su tendencia con respecto a los tiempos anteriores; teniendo la menor PPC con la dieta comercial (9.6%) y las mayores con las dietas adicionadas con Met, la dieta deficiente no fue diferente de ninguno de las anteriores.

La PAA fue mayor en la dieta deficiente (19% de Met, 18% de Lys y 17% de Arg) que en la dieta comercial (10% de Met, 15% de Lys y 10% de Arg). Las dietas adicionadas con DL-Met (0.5, 0.1, 0.2 y 0.4%) tuvieron pérdidas de 40, 52 y 96% de la Met total. La PMet libre fue calculada en función los AA libres antes y después de lixiviar, atribuyendo la Met libre al AA cristalino y no al contenido en los ingredientes. En las dietas adicionadas con 0.1, 0.2 y 0.4% de Metionina la PMet libre fue de 90-97%. En las dietas deficiente y comercial la concentración de Met libre después de lixiviar fue menor a 0.01%, fuera del rango de certidumbre del Laboratorio Degussa, y no permitió su determinación. La dieta Adicionada con 0.8% de Met presentó lixiviaciones ligeramente mayores en Lys (32%) y Arg (24%) al resto de la dietas experimentales (18-20% de Lys y 17-19% de Arg). La Cys presentó valores muy dispersos en las dietas experimentales (8-16%).

Tabla 37. ABS, PMS y PPC a los 15, 30 y 60 minutos de inmersión en los alimentos del experimento 8.

		Deficiente										ANOVA General P					
		Chícharo verde 2		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		0.8%DL-Met		Comercial							
		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS						
ABS	15minutos	91.1	14.6	d	80.3	4.34	cd	70.0	0.59	bc	66.4	2.5	b	34.0	1.35	a	<0.001
	30minutos	112	3.63	d	114	8.90	c	103	6.24	c	86.5	4.7	b	44.1	0.58	a	<0.001
	60minutos	131	14.3	c	112	15.0	b	106	1.81	b	100.9	5.0	b	64.4	2.00	a	<0.001
PMS	15minutos	7.05	0.32	c	6.21	0.28	b	7.07	0.10	c	7.2	0.2	c	2.10	0.22	a	<0.001
	30minutos	9.81	0.23	b	9.47	0.18	b	9.94	0.68	b	9.9	0.0	b	3.07	0.04	a	<0.001
	60minutos	13.4	0.40	bc	13.7	0.32	c	13.1	0.12	b	13.4	0.2	bc	3.98	0.21	a	<0.001
PPC	15minutos	14.1	0.08	b	11.7	1.38	b	12.6	0.88	b	5.8	1.201	a	13.1	1.20	b	0.004
	30minutos	13.4	0.17	b	17.6	1.07	c	17.7	0.54	c	10.82	1.572	a	16.6	1.57	c	0.002
	60minutos	12.9	3.55	ab	16.7	1.1298	b	16.7	0.71	b	15.4	0.446	b	9.57	0.45	a	0.034

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha= 0.05$).

6.8.2.2.3 Pérdida de aminoácidos

Las dietas experimentales después de ser lixiviadas perdieron sus diferencias en el contenido de Met desde los 15 minutos de inmersión (Figura 58), presentando un contenido de 0.37% de Met total, mientras los valores de Cys, Lys y Arg fueron de 0.48, 1.60 y 2.30%. La dieta comercial arrojó contenidos de 0.71, 0.37, 1.72 y 1.8% para Met, Cys, Lys y Arg respectivamente. Cuando se consideran los contenidos después de lixiviar sus proporciones Lys/Met fueron de 4.95 para la dieta deficiente, 4.79, 4.81, 4.5 y 4.26 para las dietas suplementadas con DL-Met y 2.57 para la comercial.

Las PAA solo fueron cuantificadas a los 60 minutos, debido a que no se obtuvo la humedad en las muestras de alimento después de 15 y 30 minutos de inmersión, analizadas para AA. La PAA fue mayor en la dieta deficiente (19% de Met, 18% de Lys y 17% de Arg) que en la dieta comercial (10% de Met, 15% de Lys y 10% de Arg), aun cuando éstas están constituidas de proteínas íntegras (Tabla 38 y Figura 58). Las dietas adicionadas con DL-Met (0.5, 0.1, 0.2 y 0.4%) tuvieron pérdidas de 26, 34, 40 y 52% de la Met total. La PMet libre fue casi completa (90%) en las dietas suplementadas con 0.1, 0.2 y 0.4% de DL-Met; en el caso de la dieta suplementada con 0.05% de DL-Met el contenido del AA libre después de ser lixiviada fue inferior al rango de lectura, que se puede considerar una PMet libre del 100%. La PCys varió ampliamente desde 7.8% para la dieta suplementada con 0.4% de DL Met hasta 15.3% para la dieta suplementada con 0.1% de DL-Met, mientras las PLys y PArg fueron del orden de 19% y 18%, respectivamente.

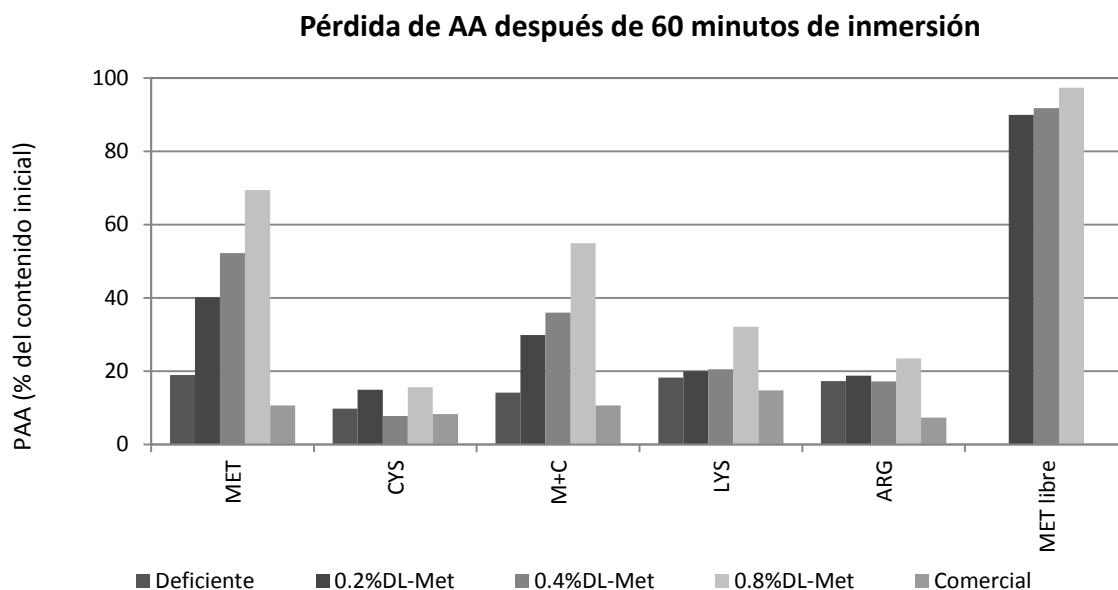


Figura 58. Porcentaje de PMet total, PCys, PMet+Cys, PLys, PArg y PMet libre a los 60 minutos de inmersión en el agua, en los alimentos del experimento 8.

Tabla 38. Porcentaje de pérdida de Met, Met libre, Lys, Arg y Cys a los 60 minutos de inmersión en agua en los alimentos del experimento 8.

	Deficiente Chícharo verde 2	0.2%DL- Met	0.4%DL- Met	0.8%DL- Met	Comercial
Met	19.0	40.2	52.2	69.4	10.6
Met Libre	--	89.9	91.8	97.4	--
Lys	18.2	20.0	20.5	32.2	14.8
Arg	17.3	18.8	17.2	23.5	7.30
Cys	9.78	15.0	7.80	15.7	8.30

6.8.3 Resultados zootécnicos

El empleo de jaulas individuales evitó el canibalismo reportado en los experimentos previo de esta tesis, sin embargo, la Suv de los camarones fue muy variable y el crecimiento muy bajo a lo largo de los 28 días de bioensayo. Los parámetros zootécnicos se evaluaron estadísticamente considerando al camarón y al acuario como unidad experimental, aunque la sobrevivencia y la biomasa únicamente pueden ser comparadas utilizando al acuario como unidad experimental. La Suv de los camarones alimentados con los diferentes tratamientos no presentó diferencias significativas ($P=0.329$), variando de 46 a 87%; la Suv fue baja inclusive con la dieta comercial (60%, Figura 59). De igual manera la biomasa no presentó diferencias ($P=0.483$) entre los tratamientos (Tabla 40).

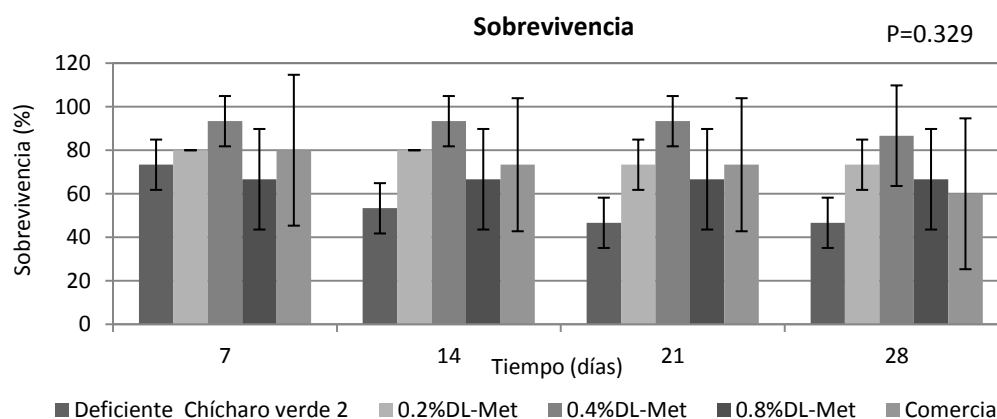


Figura 59. Sobrevivencia (5 animales iniciales) entre todos los tratamientos ($n=4$), de 0-28 días. Deficiente en Met-Lys (0.42% de Met y 2.05% de Lys). P es la probabilidad de Anova a los 28 días. Las barras indican la desviación estándar.

En la Tabla 39 se muestran los resultados de la evaluación de la zootécnica utilizando al individuo como unidad experimental, se observa una gran variabilidad en los resultados dentro de cada tratamiento, por lo que no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento (peso, GP y TCE) y consumo. Solo se encontraron diferencias significativas en la EA (en base húmeda y seca, $P=0.003$;

corregida por lixiviación $P=0.023$) y la TEP ($P=0.001$) producidas por la dieta comercial. La dieta comercial mostró valores más altos de EA en base húmeda (0.43), base seca (0.48) y corregida por lixiviación (0.50), así como de TEP (1.30) con respecto a las dietas experimentales (Figuras 60 y 61).

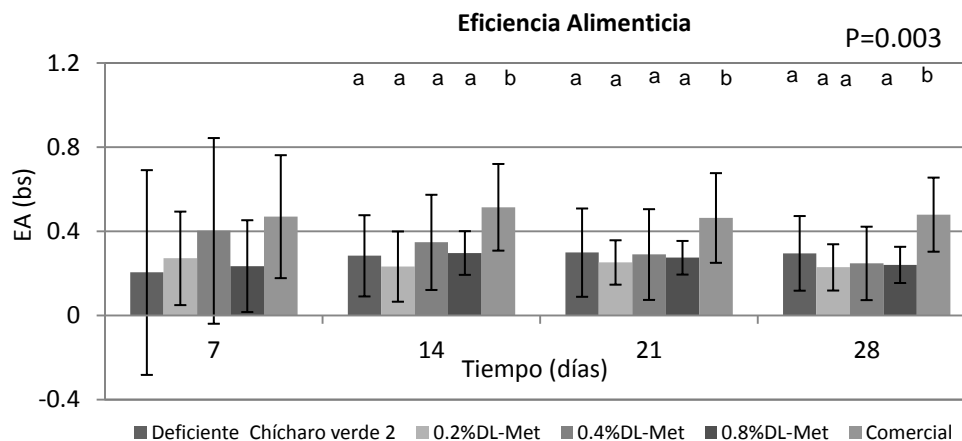


Figura 60. EA promedio (incremento en peso/alimento consumido bs, $n=15$) producida con dosis crecientes de DL-Met (0, 0.20, 0.40 y 0.8% de la dieta), de 0-28 días. P es la probabilidad de Anova a los 28 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

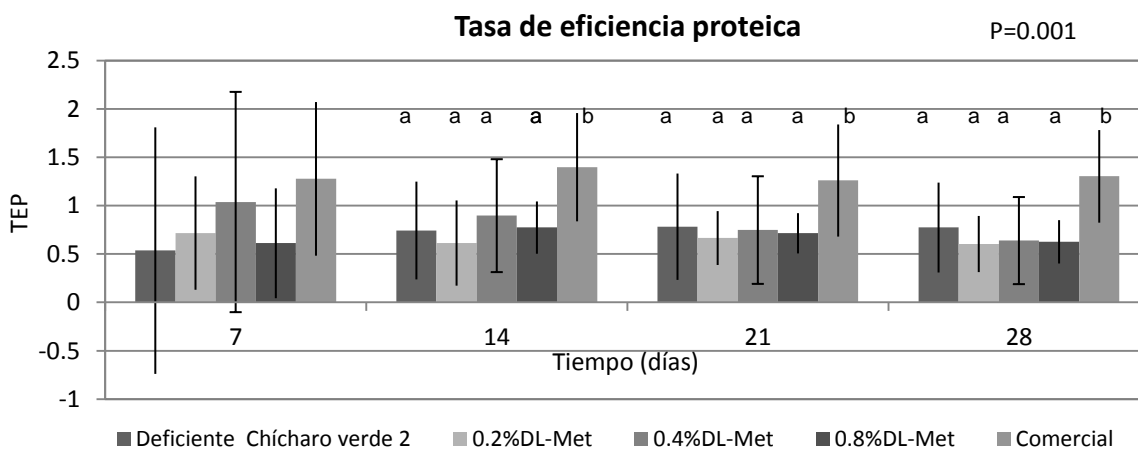


Figura 61. TEP promedio calculada en base a los análisis proximales realizados por maricultura para todos los tratamientos, a los 28 días de experimentación. P es la probabilidad de Anova a los 28 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Tabla 39. Resultados zootécnicos a los 28 días de experimentación, utilizando al individuo como la unidad experimental, para el conjunto de las dietas experimentales y la dieta comercial del experimento 8.

Dia28	Deficiente										ANOVA General P=					
	Chicharo verde 2		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		0.8%DL-Met		Comercial							
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS						
Peso	1.43	0.29	1.31	0.24	1.40	0.42	1.33	0.25	1.62	0.25	0.219					
GP	47.7	30.9	35.1	17.8	39.7	28.6	37.8	18.9	64.2	19.3	0.065					
TCE	1.32	0.81	1.04	0.51	1.12	0.79	1.12	0.49	1.75	0.43	0.108					
Conbh	1.59	0.29	1.59	0.28	1.63	0.46	1.59	0.35	1.49	0.22	0.927					
Conbs	1.44	0.26	1.42	0.25	1.46	0.41	1.44	0.32	1.35	0.20	0.940					
Conlix	1.24	0.23	1.12	0.41	1.26	0.35	1.24	0.27	1.29	0.19	0.759					
EAbh	0.27	0.16	a	0.20	0.10	a	0.22	0.16	a	0.22	0.08	a	0.43	0.16	b	0.003
EAbs	0.30	0.18	a	0.23	0.11	a	0.25	0.17	a	0.24	0.09	a	0.48	0.18	b	0.003
EAlix	0.34	0.20	a	0.27	0.13	a	0.29	0.2	a	0.28	0.10	a	0.5	0.18	b	0.023
TEP	0.77	0.46	a	0.6	0.29	a	0.64	0.45	a	0.63	0.22	a	1.3	0.48	b	0.001

El peso inicial de los animales fue 0.97 ± 0.15 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

Cuando en la evaluación zootécnica se utilizó al tanque como unidad experimental, la variabilidad se redujo, pero tampoco se detectaron diferencias significativas en los parámetros de incremento en peso (GP, TCE) y consumo. La dieta comercial fue la única que generó diferencias significativas en los parámetros de peso ($P=0.024$), EA (en base húmeda y seca, $P=0.011$; corregida por lixiviación $P=0.046$) y la TEP ($P=0.007$). Generando los valores más altos de EA en base húmeda (0.43), base seca (0.48), corregida por lixiviación (0.49), de TEP (1.30), y de peso final con respecto a los obtenidos para las dietas experimentales (Figura 62 y Tabla 40).

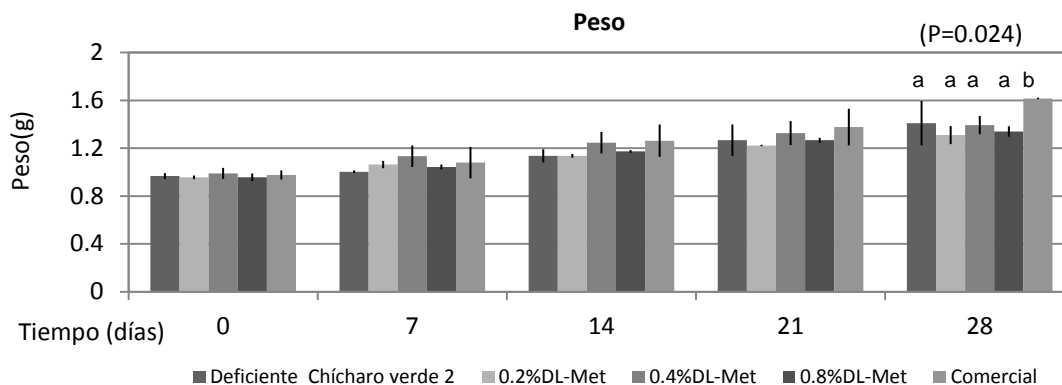


Figura 62. Incremento en el peso promedio del camarón (g, n=4) alimentados con dosis crecientes de DL-Met (0, 0.20, 0.40 y 0.8% de la dieta), de 0-28 días. P es la probabilidad de Anova a los 28 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha= 0.05$).

Tabla 40. Resultados zootécnicos a los 28 días de experimentación, utilizando al tanque como la unidad experimental, para el conjunto de las dietas experimentales y la dieta comercial del experimento 8.

Dia28	Deficiente		Chicharo verde 2		0.2%DL-Met		0.4%DL-Met		0.8%DL-Met		Comercial		ANOVA General P=
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
Peso	1.41	0.19 a	1.31	0.08 a	1.39	0.08 a	1.34	0.04 a	1.62	0.01 b			0.024
Gpeso	45.9	25.1	35.1	11.1	38.7	6.3	38.6	3.9	63.8	4.2			0.117
TCE	1.26	0.67	1.04	0.31	1.08	0.21	1.14	0.11	1.75	0.1			0.168
Suv (%)	46.6	11.6	73.3	11.6	86.7	23.1	66.7	23.1	60	34.6			0.329
Biomasa	3.34	1.24	4.8	0.83	6.08	1.82	4.42	1.42	4.85	2.8			0.483
Conbh	1.56	0.2	1.6	0.07	1.62	0.16	1.62	0.12	1.49	0.02			0.737
Conbs	1.41	0.18	1.43	0.06	1.45	0.14	1.46	0.11	1.34	0.02			0.755
Conlix	1.23	0.16	1.12	0.17	1.25	0.12	1.26	0.09	1.29	0.02			0.559
EAbh	0.26	0.13 a	0.2	0.06 a	0.22	0.05 a	0.22	0.01 a	0.43	0.01 b			0.011
EAbs	0.28	0.14 a	0.23	0.07 a	0.24	0.06 a	0.24	0.02 a	0.48	0.01 b			0.011
EAlix	0.33	0.16 a	0.27	0.08 a	0.28	0.07 a	0.28	0.02 a	0.49	0.01 b			0.046
TEP	0.74	0.37 a	0.6	0.18 a	0.62	0.15 a	0.64	0.04 a	1.29	0.03 b			0.007

El peso inicial de los animales fue 0.97 ± 0.15 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha= 0.05$).

6.9 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad

(Experimento 9)

El contenido proximal promedio de las dietas experimentales fue ligeramente más elevado en PC (35%), y menor en lípidos (7.2%), con respecto a los valores esperados, mientras que los contenidos de humedad (8.5%), ceniza (6.5%) y fibra (1.7%) correspondieron correctamente (Tabla 41). La humedad en el pellet se incrementó de 10 a 14% con el proceso de pos-acondicionamiento. El contenido de energía fue de 4.6Kcal/g y el de cromo de 0.7% que corresponden a los valores estimados (Tabla 41).

Tabla 41. Contenido nutricional analizado de los alimentos (base húmeda) del experimento 9.

Nutrientes (%)	Deficiente Chícharo verde1		Deficiente Chícharo verde 1 pos-acondicionada	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
Humedad	8.85	0.49	8.40	0.14
Humedad del pellet	10.6		14.2	
(bh)	35.1	0.26	35.4	0.4
Lípidos	7.12	0.10	7.21	0.01
Ceniza	6.55	0.03	6.50	0.00
Fibra	1.79	0.27	1.66	0.06
ELN	40.5		40.8	
Energía	4.55	0.01	4.60	0.17
Cromo	0.73	0.06	0.70	0.02

6.9.1 Análisis físico de las dietas

6.9.1.1 Capacidad de absorción de Agua

Los análisis físicos revelaron una ABS significativamente mayor (t-student) a los 15 (P=0.005), 30 (P<0.001) y 60 minutos (P<0.003) de inmersión para la dieta sin el pos-

acondicionamiento. La ABS para la dieta pos-acondicionada fue de 43, 58 y 77% a los 15, 30 y 60 minutos y prácticamente se duplicó sin el pos-acondicionamiento (Figura 63). La comparación de la ABS mediante un Anova de dos factores, para el tipo de proceso y el tiempos de inmersión, mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) para cada uno de los factores, así como en la interacción de estos dos (Tabla 42).

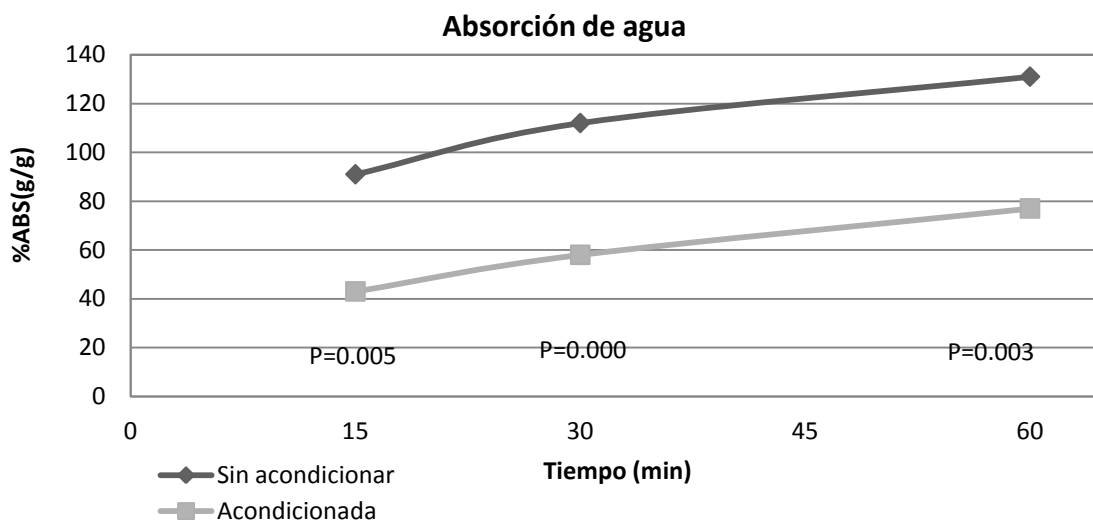


Figura 63. Comparación de la cinética de ABS de agua (%) de los alimentos sin y con pos-acondicionamiento a los 15, 30 y 60 minutos. P es la probabilidad de T-student. Las barras indican la desviación estándar y las letras indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha = 0.05$).

6.9.1.2 Estabilidad de las dietas en el agua

6.9.1.2.1 Pérdida de materia seca

La PMS de la dieta pos-acondicionada fue significativamente menor (t-student) a los 15 ($P = 0.002$), 30 y 60 minutos ($P < 0.001$) de inmersión. La PMS coincide con el incremento en la ABS de agua marina. Los valores de PMS en la dieta pos-acondicionada fueron de 4, 7.6 y 7.9% a los 15, 30 y 60 minutos, respectivamente y se duplican sin el pos-acondicionamiento (Figura 64 y Tabla 42). La comparación de la PMS mediante un Anova de dos factores, para el tipo de proceso y el tiempo de inmersión, presentó diferencias significativas ($P < 0.001$) en ambos factores pero no para la interacción.

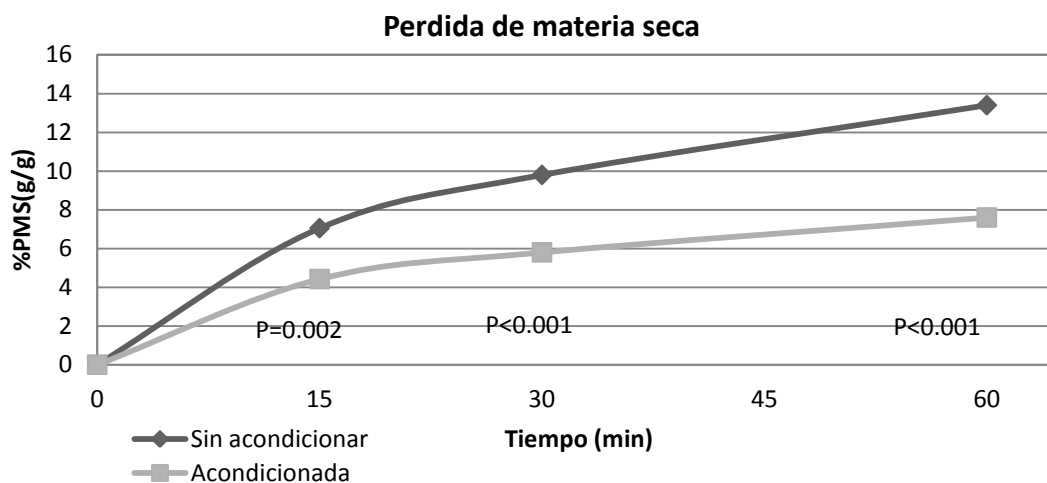


Figura 64. Comparación de la cinética de pérdida de materia seca (%) de los alimentos sin y con pos-acondicionamiento a los 15, 30 y 60 minutos. P es la probabilidad de T-student. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

Tabla 42. Evaluación de la ABS y PMS por lixiviación en los alimentos del experimento 9.

	Tiempo de inmersión	Deficiente Chicharo verde 1		Deficiente Chicharo verde 1 pos-acondicionada		T-student P=	Anova proceso P=	Anova tiempo P =	Anova interacción P=
		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS				
		ABS	15 minutos	91.0	15.0				
	30 minutos	112	4.00	58.0	1.00	0.000	<0.001	<0.001	<0.001
	60 minutos	131	14.00	77.0	2.00	0.003			
PMS	15 minutos	7.05	0.32	4.42	0.51	0.002			
	30 minutos	9.80	0.23	7.60	0.30	0.000	<0.001	<0.001	0.765
	60 minutos	13.4	0.40	7.90	0.30	0.000			

P es la probabilidad de los análisis estadísticos ($\alpha= 0.05$).

6.9.2 Resultados de digestibilidad

Los resultados del bioensayo de la digestibilidad de la dieta deficiente a base de chícharo verde 1 fueron evaluados mediante un ANOVA de dos factores, siendo el primero el efecto del proceso de pos-acondicionamiento y el segundo el efecto del origen de los camarones. Las DAMS y DAED no presentaron diferencias significativas debidas al pos-acondicionamiento de la dieta, pero si hubo diferencias en la DAP ($P=0.010$) (figura 65). Por el otro lado la DAMS, DAP y DAED de la dieta no se vio afectada significativamente por el origen de los camarones (Nayarit o Sinaloa) (Figura 66). Tampoco se presentaron diferencias significativas en la interacción de los factores proceso y origen para la DAMS, DAP y DAED de la dieta de chícharo verde 2 (Tabla 43). La DAMS fue de 78.5%, la DAED fue de 85% para la dieta deficiente de chícharo verde 1 y la DAP paso de 92 a 90% con el pos-acondicionamiento.

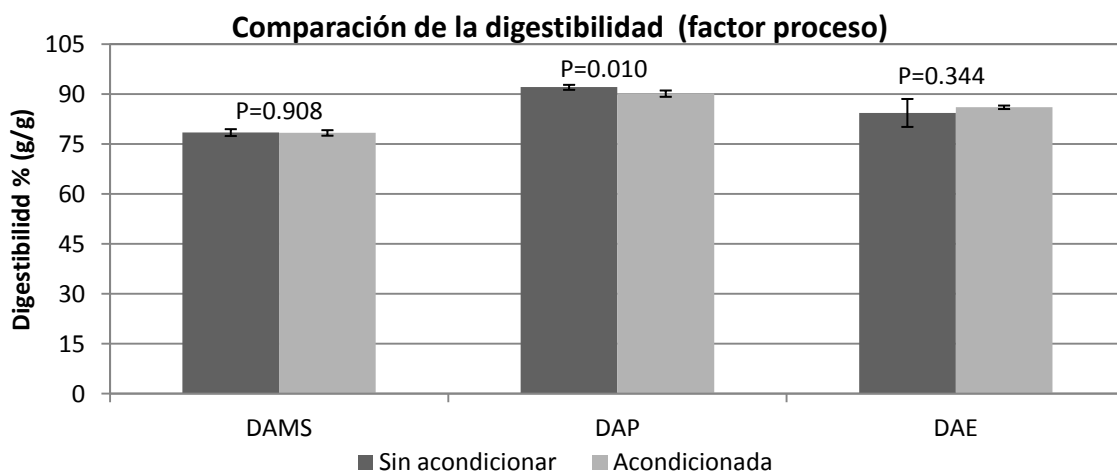


Figura 65. Efecto del proceso de pos-acondicionamiento sobre la digestibilidad de materia seca, proteína y energía. P es la probabilidad de Anova del factor proceso. Las barras indican la desviación estándar ($\alpha= 0.05$).

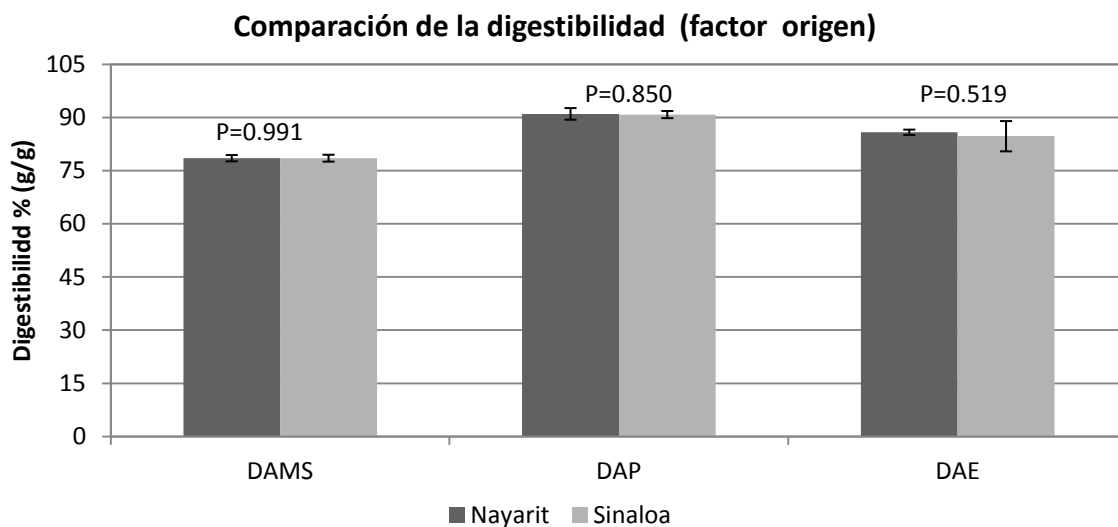


Figura 66. Efecto del origen de los animales sobre la digestibilidad de materia seca, PC y energía. P es la probabilidad de Anova del factor origen. Las barras indican la desviación estándar ($\alpha= 0.05$).

Tabla 43. Evaluación de la digestibilidad de la dieta a base de chícharo 1 con y sin pos-acondicionamiento, utilizando animales con distinto origen en el experimento 9.

	Deficiente Chicharo verde 1		Deficiente Chicharo verde 1 pos-acondicionada		T-student P=	Nayarit		Sinaloa		T-student P=	Anova proceso P=	Anova origen P=	Anova interacción P=
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS				
	DAMS	78.5	1.03	78.4		0.83	0.908	78.5	0.89				
DAP	92.1	0.75	90.2	0.95	0.010	91.0	1.64	90.8	1.01	0.991	0.010	0.520	0.200
DAED	84.4	4.2	86.1	0.52	0.344	85.8	0.76	84.7	4.27	0.519	0.360	0.520	0.340

El peso inicial de los animales fue $0.90\text{g} \pm 0.04\text{g}$. P es la probabilidad de los análisis estadísticos ($\alpha= 0.05$).

6.10 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre

la estabilidad de la dieta y rendimiento de *L. vannamei* (Experimento 10)

6.10.1 Análisis químico de las dietas

El contenido proximal fue semejante al estimado en las formulaciones, aunque se presentaron diferencias significativas en el contenido de humedad ($P=0.001$) y PC ($P<0.001$), pero no en lípidos, cenizas o energía Figura 67. La dieta únicamente pos-acondicionada presentó un contenido de PC 31%, dos puntos inferiores al resto, en tanto la humedad fue de 9%, inferior solo en un punto. El contenido en el resto de los nutrientes fue muy semejante para todos los tratamientos, el promedio en cada uno de ellos fue de 8% de lípidos, 5% de ceniza, 44% de fibra + ELN y 4.7Kcal/g de energía (Figura 67 y Tabla 44).

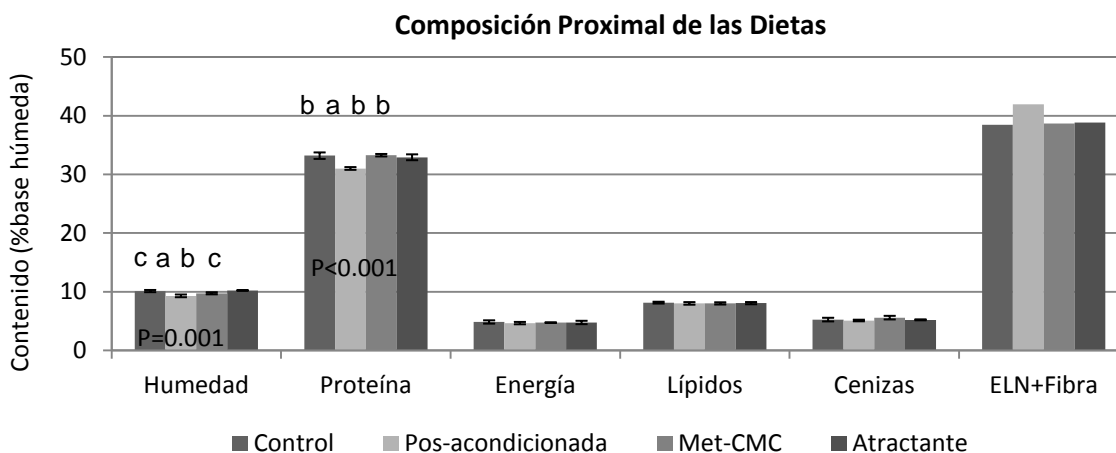


Figura 67. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 10. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

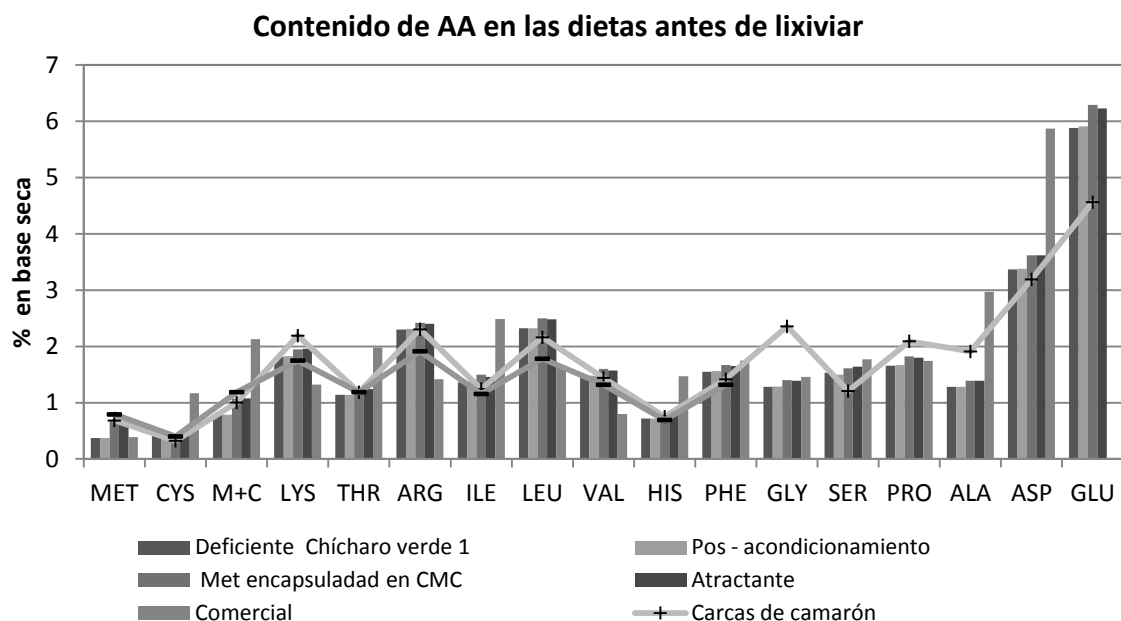
El perfil teórico y analizado de AA de las dietas en base húmeda se presenta en la Tabla 44, el análisis efectuado por Degussa arrojó valores ligeramente menores en Met y Lys, pero un poco superiores en el caso de Arg con respecto a los valores esperados. Las dietas deficientes chícharo verde 1 presentaron valores promedio de 0.37% de Met, mientras aquellas suplementadas con DL-Met encapsulada en CMC presentaron 0.67% de Met total; el resto de los AA permaneció sin cambios importantes, con valores una décima más altos para las dietas suplementadas. Las diferencias en el contenido de Met con respecto a la dieta control deficiente correspondieron con los niveles suplementados (Figura 68B). La dieta comercial mostró valores mayores de Met (0.78%) y Lys (2.13%), pero inferiores en Arg (1.98%) con respecto a la dieta de base. La dieta deficiente chícharo verde 1 sin pos-acondicionamiento presentó un menor contenido de Met (0.34), Lys (1.57%) y Arg (2.09) que las dietas pos-acondicionadas a los 60 minutos de inmersión en agua marina (Figura 68 B). Por otro lado, el contenido las dietas pos-acondicionadas fue muy homogéneo, con 0.40% de Met, 1.72% de Lys y 2.32% de Arg. El contenido de la dieta comercial lixiviada fue de 0.77% de Met, 1.98% de Lys y 1.91% de Arg.

Tabla 44. Composición proximal, contenido teórico de AA (% en base húmeda) y contenido de los AA analizados (% en base seca) antes y después de 60 minutos de inmersión en agua del experimento 10.

Nutrientes (%)	Deficiente Chicharo verde 2								Comercial	ANOVA P=					
	Pos – acondicionamiento														
	Met encapsulada en CMC				Atrayente										
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS							
Humedad	10.1	0.20	c	9.29	0.23	a	9.73	0.18	b	10.2	0.10	c	9.8	0.05	0.001
Proteína	33.2	0.55	b	31.0	0.23	a	33.3	0.21	b	32.9	0.50	b	33.2	0.3	<0.001
Lípidos	8.14	0.16		8.01	0.2		8.01	0.19		8.05	0.19		7.33	0.2	0.823
Ceniza	5.25	0.30		5.09	0.14		5.58	0.31		5.20	0.10		6.93	0.07	0.136
Fibra + ELN	43.3			46.6			43.4			43.6			42.7		
Energía (Kcal/g)	4.84	0.3	ab	4.65	0.2	a	4.73	0.06	b	4.76	0.3	ab	1.38	0.1	0.844
Contenido total teórico de Met	0.41			0.41			0.71			0.71			0.72		
Contenido total teórico de Cys	0.47			0.47			0.47			0.47			0.36		
Contenido total teórico de Lys	2.00			2.00			2.00			2.00			1.97		
Contenido total teórico de Arg	2.10			2.10			2.10			2.10			2.09		
Relación Lys/Met	4.88			4.88			2.82			2.82			2.74		
Contenido analizado de Met	0.37			0.37			0.67			0.67			0.78		
Contenido analizado de Cys	0.42			0.42			0.44			0.45			0.47		
Contenido analizado de Lys	1.81			1.83			1.95			1.96			2.13		
Contenido analizado de Arg	2.30			2.31			2.42			2.40			1.98		
Relación Lys/Met	4.89			4.95			2.91			2.93			2.73		
Contenido de Met después de lixiviar	0.34			0.38			0.40			0.40			0.77		
Contenido de Cys después de lixiviar	0.42			0.47			0.46			0.47			0.39		
Contenido de Lys después de lixiviar	1.57			1.71			1.73			1.72			1.98		
Contenido de Arg después de lixiviar	2.09			2.32			2.34			2.31			1.91		
Relación Lys/Met	4.62			4.50			4.33			4.30			4.30		

P es la probabilidad de Anova al considerar los tratamientos experimentales. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha= 0.05$).

A)



B)

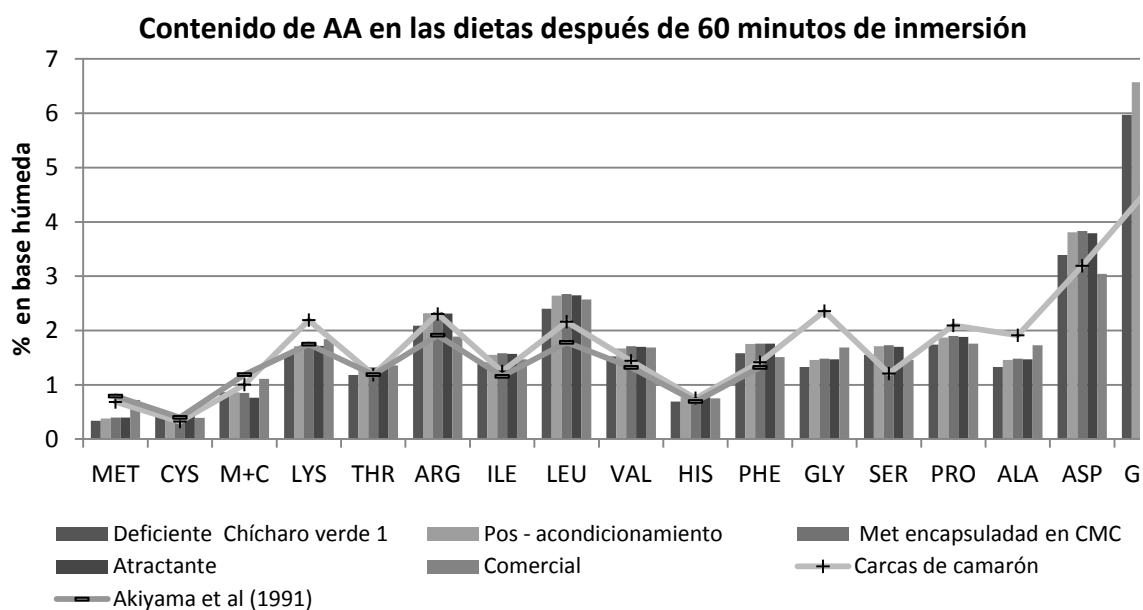


Figura 68. Contenido de AA en las dietas (A) antes y (B) después de 60 minutos de inmersión (% en base seca).

Contenido de AA de la dietas antes y después de 60 minutos de inmersión

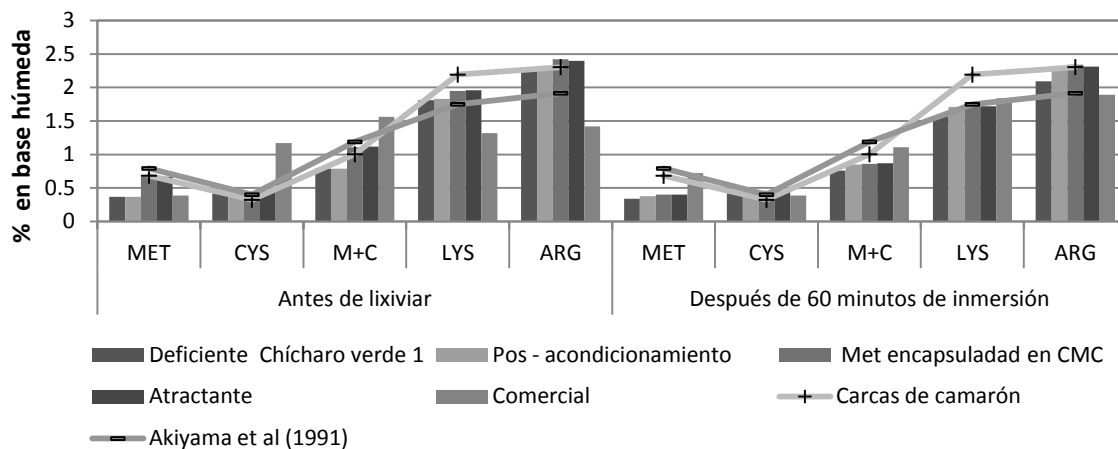


Figura 69. Contenido de Met, Cys, Met+Cys, Lys y Arg en la dietas antes y después de 60 minutos de inmersión en agua (% en base seca).

6.10.2 Análisis físico de las dietas

6.10.2.1 Capacidad de absorción de Agua

Las dietas experimentales no mostraron diferencias significativas ($P < 0.410$) en la ABS de agua a los 60 minutos de inmersión, con un valor promedio de 87% como se aprecia en la Figura 70.

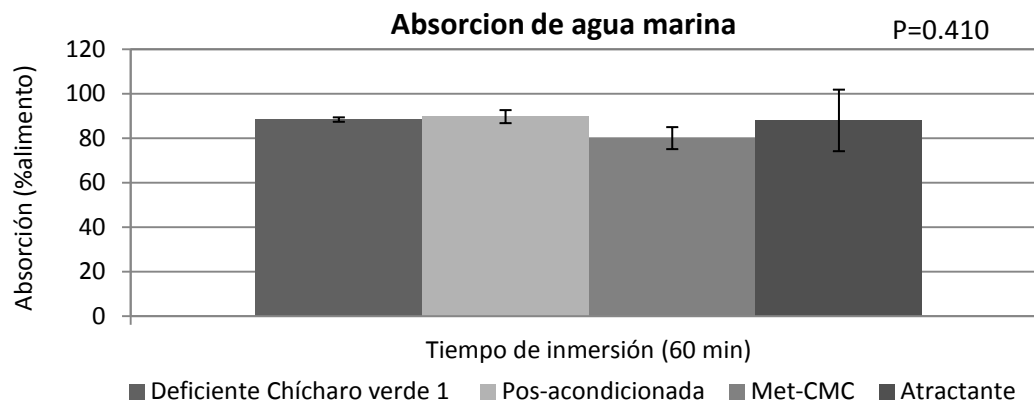


Figura 70. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos a los 60 minutos. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntas homogéneas definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

6.10.2.1 Estabilidad de las dietas en el agua

6.10.2.1.1 Pérdida de materia seca

La PMS indicó una reducción significativa ($P<0.001$) del 30% con el proceso de pos-acondicionamiento a los 60 minutos de inmersión, pasando de 13.2 a 9.17%. Los procesos de suplementación de Met encapsulada en CMC o la adición de atrayente no influyeron sobre la PMS de las dietas (Figura 71 y en la Tabla 45).

6.10.2.1.2 Pérdida de proteína

El comportamiento en las PMS de las dietas experimentales no indicó alguna correlación con el comportamiento de las PPC. La PPC en la dieta sin pos-acondicionar fue de 41.2% y se redujo significativamente ($P<0.001$) en un 36% con el pos-acondicionamiento. Por otra parte, las incorporaciones de DL-Met encapsulada en CMC y un atrayente incrementaron significativamente las PPC en 21 y 32% respecto a la dieta pos-acondicionada (Figura 71). Las PPC calculadas a partir de los valores analizados por Degussa son ampliamente inferiores, sin embargo siguen el mismo comportamiento (Tabla 45).

6.10.2.1.3 Pérdida de energía

Las PE en las dietas experimentales no se encuentran correlacionados con las PMS a los 60 minutos de inmersión, sin embargo están bien correlacionadas con las PPC (R=0.98 y P=0.020). Las diferencias en PE entre las dietas experimentales fueron marginalmente significativas (P=0.059), presentando un decremento del 46% con el pos-acondicionamiento y un repunte del 20% con la suplementación de DL-Met encapsulada (Figura 71 y Tabla 45).

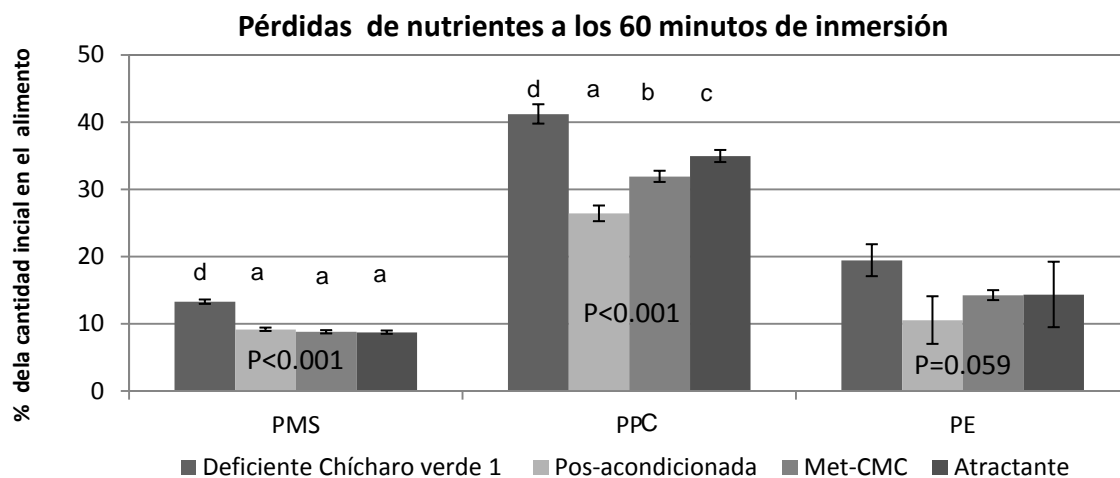


Figura 71. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 10 a los 15, 30 y 60 minutos. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Tabla 45. Evaluación de la ABS, PMS, PPC y PE por lixiviación en los alimentos del experimento 10.

	Deficiente Chícharo verde 1								ANOVA General P=	
	Pos - acondicionamiento									
					Met encapsulada en CMC					
					Atrayente					
	\bar{x}	DS		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
ABS	88.4	1.00		89.7	2.93	80.1	4.95	88.1	13.8	0.410
PMS	13.2	0.33	b	9.17	0.25	a	8.80	0.24	a	<0.001
PPC										
Maricultura PPC	41.2	1.44	d	26.4	1.16	a	31.9	0.83	b	<0.001
Degussa	12.9			0.32			5.33		6.26	
PE	19.4	2.38	b	10.5	3.54	a	14.3	0.74	ab	0.059

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha= 0.05$).

6.10.2.1.4 Pérdida de aminoácidos

Las PAA a los 60 minutos de inmersión en agua marina estuvieron estrechamente correlacionadas ($R > 0.99$ y $P < 0.013$) con la PPC utilizando los valores de Degussa y bien correlacionadas con los valores de Maricultura ($R > 0.96$ y $P < 0.039$). El pos-acondicionamiento redujo las PMet, PLys, PArg y PCys en 65, 37, 56, y 100%, aunque no fue eficiente en aumentar la retención de la DL-Met encapsulada en agar, que se lixivió por completo a los 60 minutos de inmersión (Figura 73, Tabla 46). Por otro lado la adición de DL-Met encapsulada y el atrayente incrementaron las pérdidas de Lys en 30%, de PArg en 30% y de Cys en 6% con respecto a la dieta únicamente pos-acondicionada. El AA más lixiviado en los alimentos con los diferentes procesos fue la Lys. La PMet libre no se redujo con la encapsulación de en CMC.

Tabla 46. Porcentaje de PMet total, PMet encapsulada, PLys total, PArg y PCys a los 60 minutos de inmersión en agua.

	Deficiente Chícharo verde 1			
	Pos - acondicionamiento			
	Met encapsulada en CMC			
	Atrayente			
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
PPC	13.0	0.30	5.30	6.30
Met	20.6	7.4	46.4	46.3
Met encapsulada	--	--	99.9	99.9
Lys	25.0	15.8	20.3	21.0
Arg	21.5	9.5	13.2	13.4
Cys	13.5	-0.88	6.10	6.00

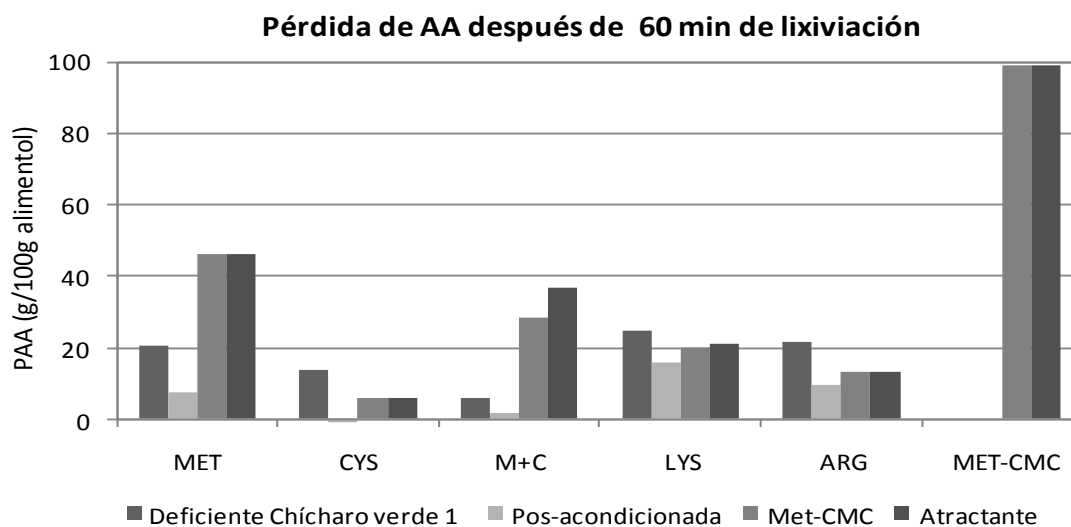


Figura 72. Porcentaje de PMet total, PCys, PMet+PCys, PLys, PArg y PMet encapsulada a los 60 minutos de inmersión en agua.

6.10.3 Resultados zootécnicos

El uso de jaulas individuales evitó el canibalismo, aún así, la Suv se vio disminuida con el tiempo de experimentación. La implementación de los distintos procesos sobre la dieta deficiente chícharo verde 1 no mejoró significativamente ninguno

de los parámetros zootécnicos evaluados (Suv, crecimiento (peso, GP y TCE), biomasa, consumo, EA o TEP) a lo largo de 35 días considerando al tanque o al camarón como unidad experimental (Tabla 47 y 48). La Suv y la biomasa únicamente pueden ser calculadas a partir del acuario.

Tabla 47. Evaluación de los parámetros zootécnicos acumulados a los 35 días, utilizando al tanque como la unidad experimental, para las dietas experimentales del experimento 10.

	Deficiente Chicharo verde 1								ANOVA P=
	Pos – acondicionamiento								
	Met encapsulada en CMC								
	Atrayente								
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
Peso	0.84	0.06	0.84	0.02	0.86	0.01	0.77	0.04	0.121
Gpeso	23.5	8.20	22.0	1.70	31.0	1.70	20.2	5.50	0.121
TCE	0.59	0.19	0.54	0.05	0.74	0.02	0.49	0.14	0.139
Suv	73.3	11.5	93.3	11.5	86.7	11.5	86.7	23.1	0.424
Biomasa	3.09	0.66	3.92	0.47	3.73	0.46	3.38	1.04	0.505
Conbh	0.88	0.05	0.81	0.15	0.89	0.15	0.79	0.17	0.778
Conbs	0.88	0.05	0.81	0.15	0.88	0.15	0.79	0.17	0.777
Conlix	0.68	0.04	0.67	0.13	0.73	0.12	0.65	0.14	0.838
EAbh	0.17	0.06	0.20	0.03	0.25	0.03	0.18	0.04	0.164
EAbs	0.19	0.06	0.22	0.04	0.28	0.03	0.20	0.04	0.170
Elix	0.22	0.08	0.24	0.04	0.31	0.03	0.22	0.04	0.216
TEP	0.52	0.19	0.63	0.11	0.76	0.08	0.54	0.11	0.180

El peso inicial de los animales fue $0.67 \pm 0.002g$. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

Tabla 48. Evaluación de los parámetros zootécnicos acumulados a los 35 días, utilizando al camarón como la unidad experimental, para las dietas experimentales del experimento 10.

	Deficiente Chícharo verde 1								ANOVA P=
	Pos – acondicionamiento								
	Met encapsulada en CMC								
	Atrayente								
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
Peso	0.84	0.17	0.84	0.14	0.86	0.15	0.78	0.16	0.509
Gpeso	24.0	12.2	22.0	18.4	31.1	19.7	20.6	22.4	0.500
TCE	0.60	0.30	0.54	0.43	0.74	0.43	0.49	0.51	0.470
Conbh	0.88	0.12	0.80	0.25	0.89	0.36	0.81	0.39	0.848
Conbs	0.79	0.11	0.73	0.22	0.80	0.32	0.73	0.35	0.857
Conlix	0.69	0.09	0.66	0.20	0.73	0.30	0.67	0.32	0.883
EAbh	0.18	0.09	0.20	0.16	0.25	0.16	0.18	0.18	0.601
EAbs	0.20	0.11	0.22	0.17	0.28	0.17	0.20	0.20	0.609
Elix	0.23	0.12	0.24	0.19	0.30	0.19	0.22	0.22	0.644
TEP	0.54	0.29	0.63	0.51	0.75	0.47	0.54	0.54	0.638

El peso inicial de los animales fue 0.67 ± 0.002 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

A pesar de que la Suv no presentó diferencias significativas ($P=0.424$), la dieta sin pos-acondicionar reflejó una menor Suv desde los 7 días (Figura 73). Como los resultados zootécnicos obtenidos a los 35 días de bioensayo no eran los esperados, se decidió a continuar el bioensayo de crecimiento por 7 días más; donde la dieta espreada con el atrayente y con menor incremento en peso (GP y TCE) hasta ese momento fue sustituida por una dieta comercial, como control externo del crecimiento en la sala de bioensayos. Los parámetros zootécnicos se calcularon y evaluaron del día 36 al 42 (Tabla 49), donde se observó una recuperación en la GP de -3 a 7% y TCE -0.56 a 0.95 del camarón. Incluso se encontraron diferencias significativas en GP ($P=0.042$) y TCE ($P=0.040$) entre la dieta comercial y la dieta sin pos-acondicionamiento, pero no hubo diferencias de las dietas pos-acondionadas con ninguna de las anteriores (Figura 74). El resto de los parámetros no presentaron diferencias significativas incluyendo la Suv ($P=0.697$).

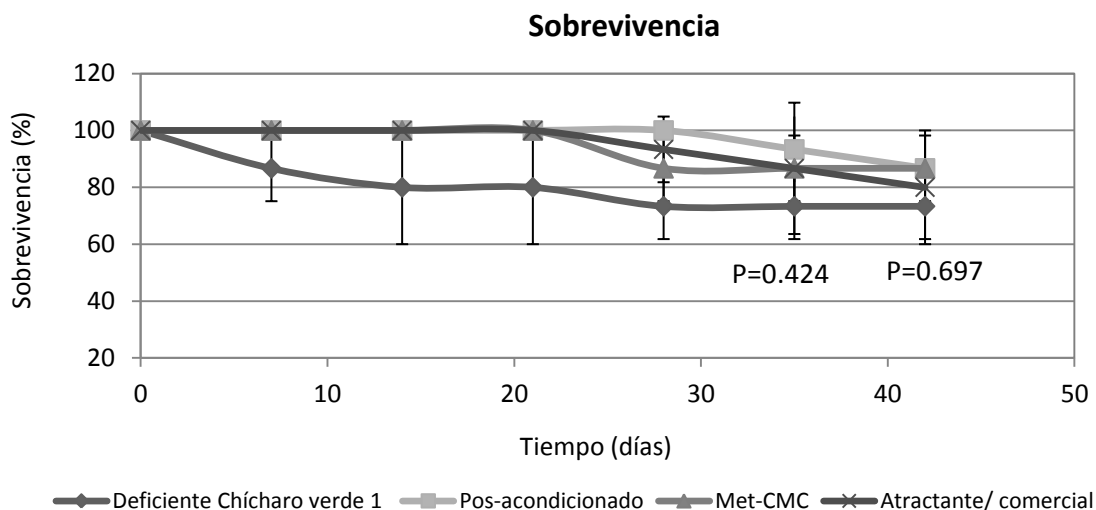


Figura 73. Sobrevivencia (5 animales iniciales) de los camarones alimentados con los distintos tratamientos, de 0-42 días. P es la probabilidad de Anova a los 35 y 42 días. Las barras indican la desviación estándar.

Tabla 49. Evaluación de los parámetros zootécnicos calculados de los 36-42 días del bioensayo, utilizando al tanque como la unidad experimental, para las dietas experimentales del experimento 10.

	Deficiente Chicharo verde 1														
	Pos -acondicionamiento				Met encapsulada en CMC				Comercial	P					
	\bar{x}	DS			\bar{x}	DS					\bar{x}	DS			
Peso	0.83	0.06			0.86	0.02			0.89	0.04	0.84	0.06	0.366		
GP	-1.12	1.88	a		1.65	1.34	ab		3.60	4.34	ab	7.10	2.92	b	0.042
TCE	-0.19	0.28	a		0.23	0.19	ab		0.49	0.60	ab	0.95	0.38	b	0.040
Suv	73.3	11.5			86.7	11.5			86.7	11.5		80.0	20.0		0.697
Biomasa	3.05	0.65			3.74	0.55			3.86	0.39		3.39	1.08		0.534
Conbh	0.13	0.01			0.11	0.01			0.12	0.02		0.13	0.03		0.525
Conbs	0.12	0.01			0.10	0.01			0.11	0.02		0.12	0.03		0.564
Conlix	0.10	0.01			0.09	0.01			0.10	0.02		0.11	0.03		0.614
EAbh	-0.20	0.21			0.06	0.13			0.19	0.40		0.43	0.13		0.065
EAbs	0.50	0.15			0.68	0.04			0.71	0.21		0.57	0.20		0.404
Elix	0.26	0.13			0.28	0.06			0.11	0.15		0.08	0.25		0.372
TEP	-0.61	0.62			-0.34	1.35			0.56	1.19		0.57	1.66		0.577

El peso inicial de los animales fue 0.67 ± 0.002 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

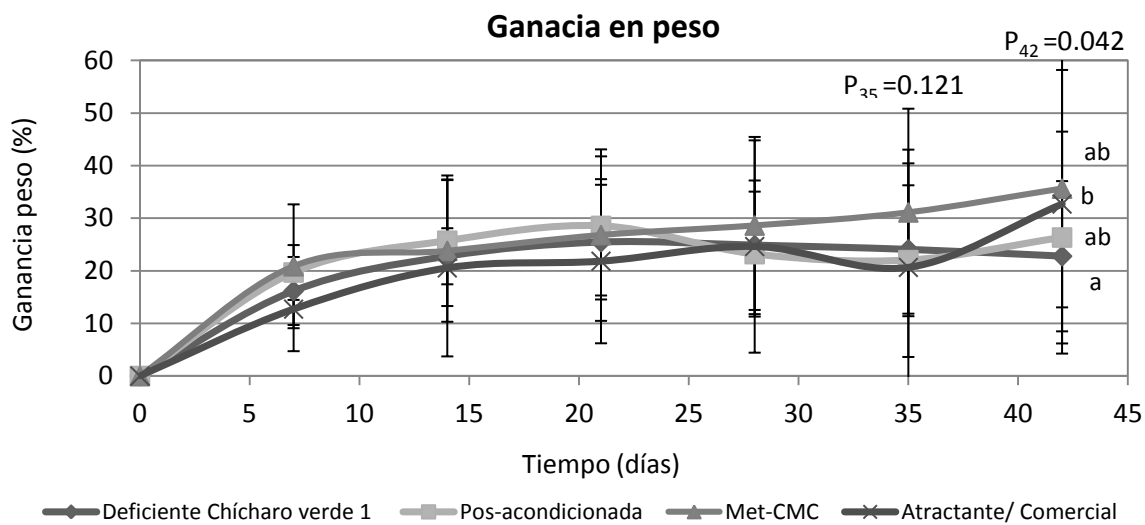


Figura 74. GP acumulada promedio (% , $n_{\text{tanque}}=3$) alimentados con la dieta deficiente chícharo verde 1 procesada de distinta manera, de 0-42 días. P_{35} es la probabilidad de Anova de la ganancia en peso acumulada los 35 días y P_{42} es la probabilidad de Anova de la GP semanal de 35 a 42 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

6.11 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de *L. vannamei*

(Experimento 11)

6.11.1 Análisis químico de las dietas

El contenido proximal no presentó diferencias significativas para el contenido de PC, aunque si fueron significativas para humedad ($P=0.010$), lípidos ($P=0.024$), cenizas ($P<0.001$), fibra ($P=<0.001$) y energía ($P=<0.001$). El contenido proximal de las dietas experimentales fue de 10 a 11% de humedad, de 20 a 24% de PC, de 7.7 a 8.6% de lípidos, de 6.4-8.4% de ceniza, de 1.0 a 6.6% la fibra, de 43 a 53% ELN y la energía de 4.4-4.8 Kcal/g siendo semejantes a los esperado (Figuras 75, 76 y Tabla 50).

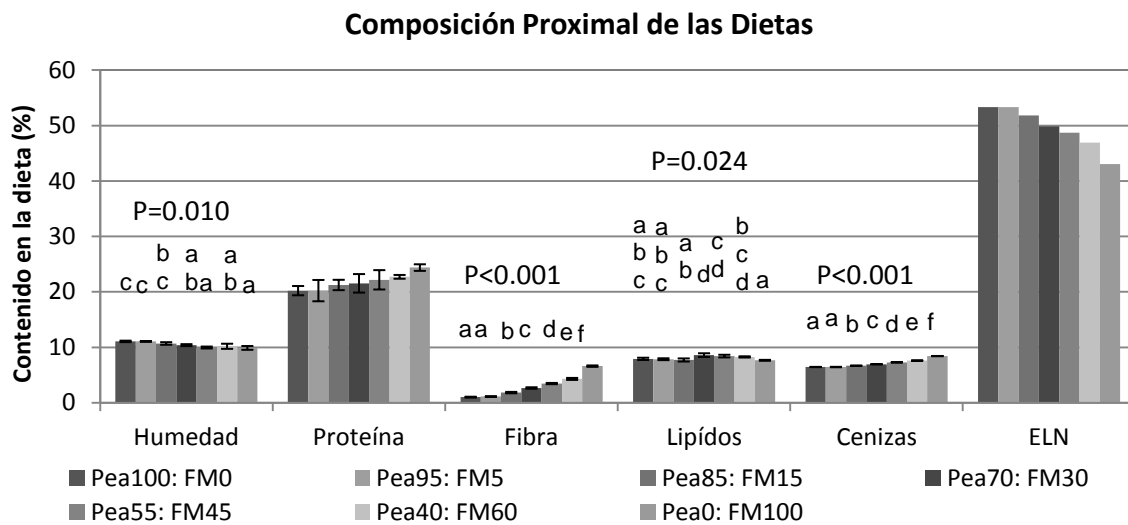


Figura 75. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 11. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

Composición proximal de las dietas

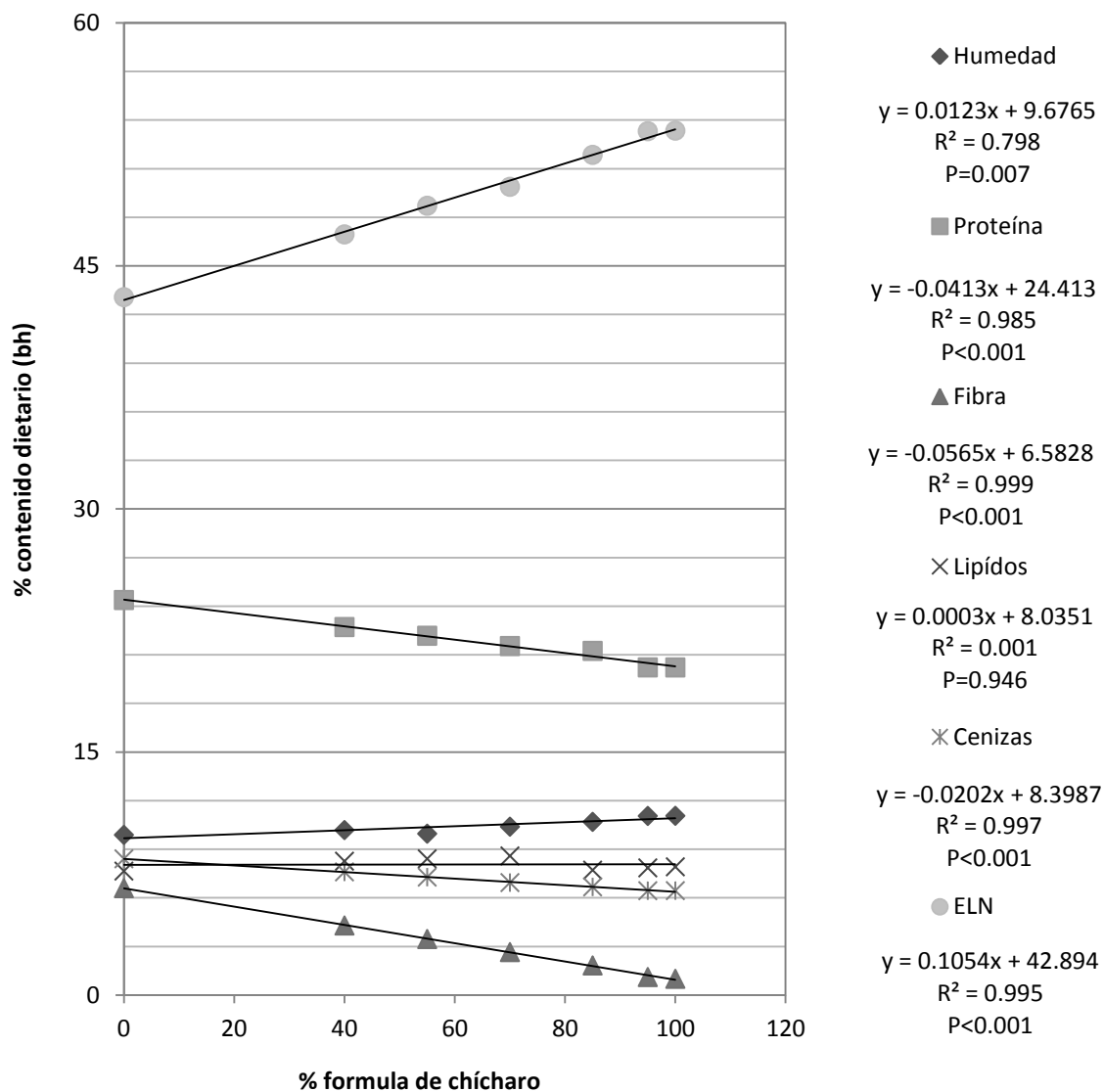


Figura 76. Composición proximal de los alimentos correspondientes al experimento 11 y su correlación con el porcentaje de inclusión de la fórmula deficiente chícharo verde 3. Debajo de cada nutriente se presenta la ecuación de la regresión lineal (y), el coeficiente de determinación (R^2) y la probabilidad de la regresión (P).

Tabla 50. Contenido proximal analizado de los alimentos (base húmeda) y de AA (base seca) del experimento 11.

	Deficiente verde 3		Chícharo		95% PCh: 5% PP		85% PCh: 15% PP		70% PCh: 30% PP		55% PCh: 45% PP		40% PCh: 60% PP		100% proteína de pescado		Anova P=					
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS						
Humedad	11.1	0.13	c	11.1	0.01	c	10.7	0.23	bc	10.4	0.18	ab	9.96	0.18	a	10.2	0.46	ab	9.89	0.34	a	0.01
Proteína	20.2	0.83	a	20.2	1.92	a	21.2	0.93	ab	21.5	1.67	ab	22.2	1.75	ab	22.7	0.34	ab	24.4	0.59	b	0.117
Lípidos	7.92	0.2	abc	7.85	0.17	abc	7.71	0.28	abc	8.59	0.33	d	8.41	0.24	cd	8.26	0.11	acd	7.65	0.08	a	0.024
cenizas	6.44	0.03	a	6.44	0.04	a	6.67	0.02	b	6.94	0.01	c	7.28	0.01	d	7.6	0.01	e	8.41	0.02	f	<0.001
Fibra	1.01	0.08	a	1.11	0.02	a	1.83	0.13	b	2.65	0.13	c	3.46	0.11	d	4.3	0.18	e	6.6	0.13	f	<0.001
Energía	4.76	0.08	d	4.59	0.02	bc	4.51	0.01	ab	4.65	0.06	bcd	4.44	0.05	a	4.41	0.06	a	4.73	0.07	cd	0.002
ELN	53.3			53.3			51.9			49.9			48.7			46.9			43.1			
Contenido teórico de:																						
Met	0.17			0.19			0.24			0.31			0.39			0.46			0.65			
Cys	0.31			0.3			0.29			0.28			0.27			0.26			0.22			
Lys	1.52			1.54			1.57			1.62			1.68			1.73			1.87			
Thr	0.68			0.69			0.72			0.77			0.81			0.86			0.98			
Arg	1.87			1.84			1.79			1.71			1.64			1.56			1.35			
Ile	0.92			0.92			0.93			0.95			0.97			0.99			1.03			
Leu	1.5			1.52			1.54			1.58			1.62			1.66			1.77			
Val	1.02			1.03			1.05			1.09			1.12			1.15			1.24			
His	0.49			0.5			0.51			0.52			0.53			0.55			0.58			
Phe	1			1			0.99			0.99			0.98			0.97			0.95			
Trp	0.17			0.17			0.18			0.18			0.19			0.2			0.22			
Pro	0.81			0.81			0.82			0.83			0.84			0.85			0.89			

Continuación tabla 50

	Deficiente Chicharo verde 3		95% PCh: 5% PP		85% PCh: 15% PP		70% PCh: 30% PP		55% PCh: 45% PP		40% PCh: 60% PP		100% proteína de pescado		Anova P=
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	
Contenido analizado de:															
Met	0.18		0.2		0.25		0.31		0.38		0.44		0.62		
Cys	0.28		0.28		0.27		0.27		0.26		0.25		0.23		
Lys	1.49		1.51		1.55		1.6		1.66		1.71		1.86		
Thr	0.72		0.73		0.76		0.8		0.84		0.88		0.99		
Arg	1.83		1.8		1.75		1.68		1.6		1.52		1.32		
Ile	0.89		0.9		0.92		0.94		0.97		0.99		1.06		
Leu	1.52		1.53		1.56		1.61		1.65		1.69		1.81		
Val	1.01		1.02		1.05		1.09		1.12		1.16		1.26		
His	0.49		0.49		0.5		0.51		0.52		0.53		0.56		
Phe	1.01		1.01		1.01		1		1		0.99		0.98		
Trp	0.23		0.23		0.24		0.25		0.27		0.28		0.31		
Pro	0.79		0.8		0.81		0.83		0.85		0.87		0.92		

El contenido de AA fue analizado para las dietas extremo y estimado para las mezclas. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

El perfil de AA de las dietas con 100% proteína de chícharo y 100% proteína de pescado fue muy próximo al estimado en las formulaciones (Figura77). La dieta a base de 100% proteína chícharo presentó una deficiencia de 60% en Met con respecto al perfil del carcas de camarón, la cual se redujo a 55, 46, 32, 17% y hasta cubrir este nivel al sustituir con los niveles de 5, 15, 30 45 y 60% de la fórmula con 100% proteína de pescado. Así mismo se presentó una deficiencia de 8% en Thr que se redujo a 4% con la sustitución de 5% de la fórmula 100% proteína de pescado. Por otra parte la dieta a base de 100% de proteína de pescado presentó una deficiencia de 15% en Arg. El resto de los AAI cubrió el contenido para 22% de proteína de camarón.

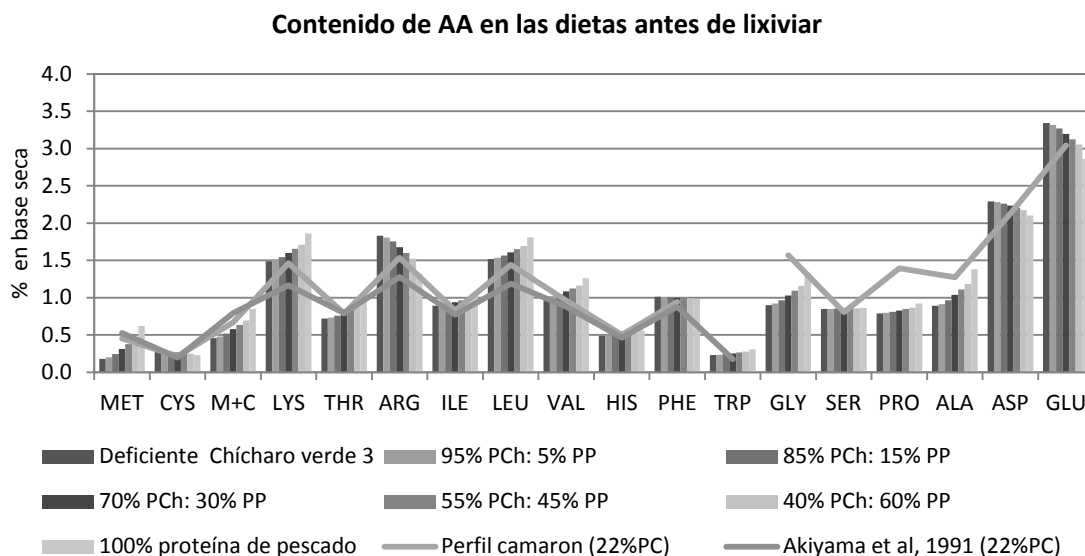


Figura 77. Contenido estimado de los AA dietarios obtenido a partir del contenido analizado en las dietas de base con 100% de proteína de chícharo y 100% de proteína de pescado del experimento11.

6.11.2 Análisis físico de las dietas

6.11.2.1 Capacidad de absorción de Agua

Los análisis físicos de las dietas mostraron diferencias significativas en la ABS a los 60 minutos de inmersión ($P=0.003$). El contenido de harina de chícharo no se correlacionó con la ABS, incluso las dietas con 100% de proteína de chícharo o proteína de pescado presentaron niveles semejantes. La dieta con 95% proteína de chícharo presentó la menor ABS (86%), en tanto aquella de 85% proteína de chícharo presentó el nivel más elevado (126%), el resto de las dietas reflejaron una ABS promedio de 106% (Figura 78 y Tabla 51).

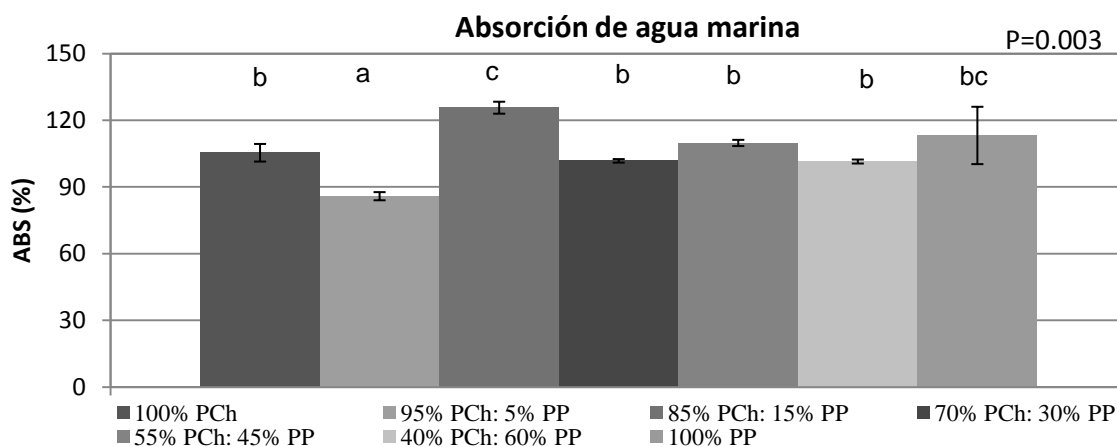


Figura 78. Comparación de absorción de agua (%) entre los alimentos del experimento 11 a los 60 minutos. PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

6.11.2.2 Estabilidad de las dietas en el agua

6.11.2.2.1 Pérdida de materia seca

En la Figura 79 se aprecia que la PMS de los alimentos experimentales presentó diferencias significativas ($P<0.001$) a los 15 minutos de inmersión en agua (de 5.8 a

11.8%). La PMS en los alimentos aumentó en una correlación positiva ($R=0.952$ y $P=0.001$) con el incremento en el contenido de harina de chícharo de los alimentos experimentales (Figura 79 y Tabla 51).

6.11.2.2.2 Pérdida de proteína

Los alimentos experimentales presentaron diferencias significativas ($P<0.001$) en la PPC. La PPC de entre 15 y 25% no se relacionó con el contenido de harina de chícharo en las dietas (Figura 79 y Tabla 51).

6.11.2.2.3 Pérdida de energía

La PE en los alimentos experimentales presentó diferencias significativas ($P<0.001$) a los 15 minutos de inmersión en agua. La PE en los alimentos siguió la misma tendencia que la PMS, excepto para la dieta 100% PP. Por otra parte, la PE estuvo positivamente correlacionada ($R=0.969$ y $P=0.001$) con el incremento en el contenido de harina de chícharo en los alimentos, como ocurrió con la PP. (Figura 79 y Tabla 51).

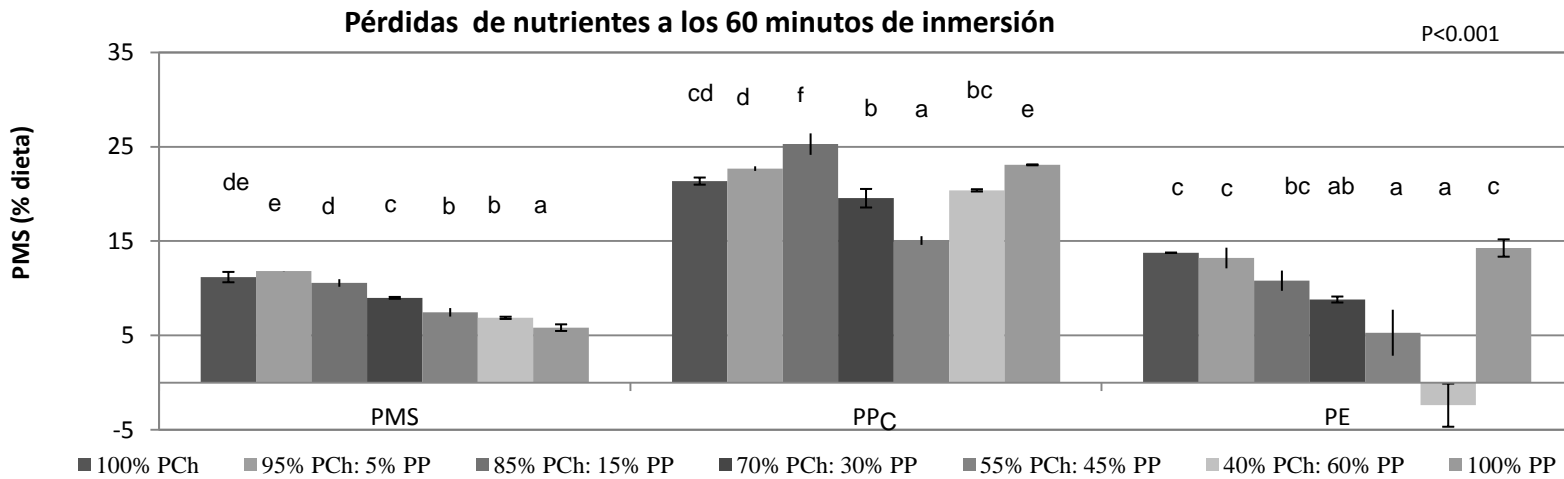


Figura 79. Comparación de pérdida de materia seca (%) entre los alimentos del experimento 11 a los 60 minutos. PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha= 0.05$).

Tabla 51. ABS, PMS, PPC y PE a los 60 minutos en los alimentos del experimento 11.

	Deficiente Chícharo verde 3			95% PCh: 100% PP			85% PCh: 15% PP			70% PCh: 30% PP			55% PCh: 45% PP			40% PCh: 60% PP			100% proteína de pescado		ANOVA General P	
	\bar{x}	DS	b	\bar{x}	DS	a	\bar{x}	DS	c	\bar{x}	DS	b	\bar{x}	DS	a	\bar{x}	DS	b	\bar{x}	DS		bc
ABS	105	4.0	b	85.9	1.8	a	126	2.7	c	102	0.8	b	110	1.4	b	101	0.9	b	113	12.9	bc	0.003
PMS	11.2	0.55	de	11.8	0.01	e	10.6	0.40	d	8.99	0.10	c	7.46	0.45	b	6.87	0.12	b	5.83	0.35	a	<0.001
PPC	21.4	0.38	c	22.7	0.24	d	25.3	1.14	f	19.5	0.98	b	15.1	0.46	a	20.4	0.12	bc	23.1	0.05	e	<0.001
PE	13.8	0.03	c	13.2	1.09	c	10.8	1.07	bc	8.8	0.32	ab	5.3	2.44	a	-2.4	2.29	a	14.3	0.92	c	<0.001

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

6.11.3 Resultados zotécnicos

La sobrevivencia de los camarones alimentados con los distintos tratamientos, incluso con el alimento 100% PCh (deficiente en varios AAI) fue buena (89-100%) y no presentó diferencias significativas ($P=0.722$) a los 29 días de bioensayo (Figura 80 y Tabla52).

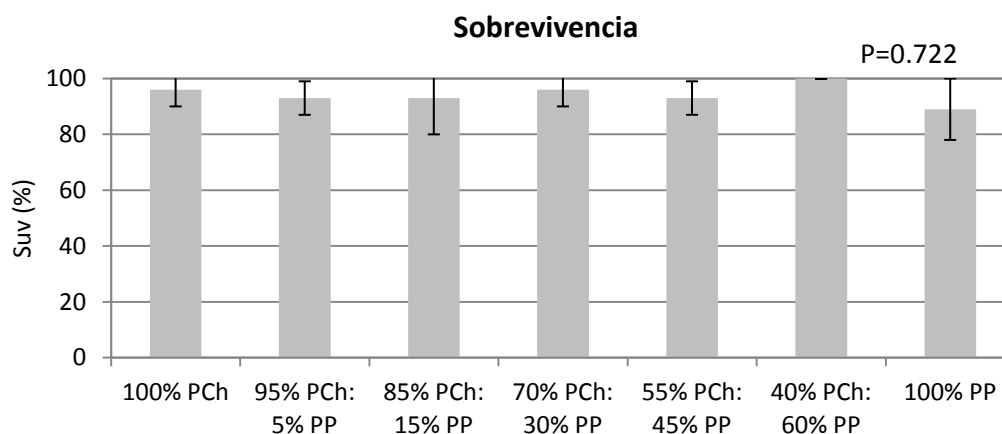


Figura 80. Sobrevivencia promedio (7 animales finales) de todos los tratamientos ($n=3$) a los 29 días. PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar.

La dieta con 100% proteína de chícharo presentó un pobre crecimiento (GP de 64% y TCE de 1.71), sin embargo el reemplazo por proteína de pescado mejoró significativamente ($P<0.001$) el rendimiento del camarón, hasta obtener niveles de 236% de GP y 4.17 de TCE con el 100% de proteína de pescado (Figura 81). La GP y TCE mostraron una correlación negativa ($R<0.94$ y $P<0.001$) con el nivel de proteína de chícharo.

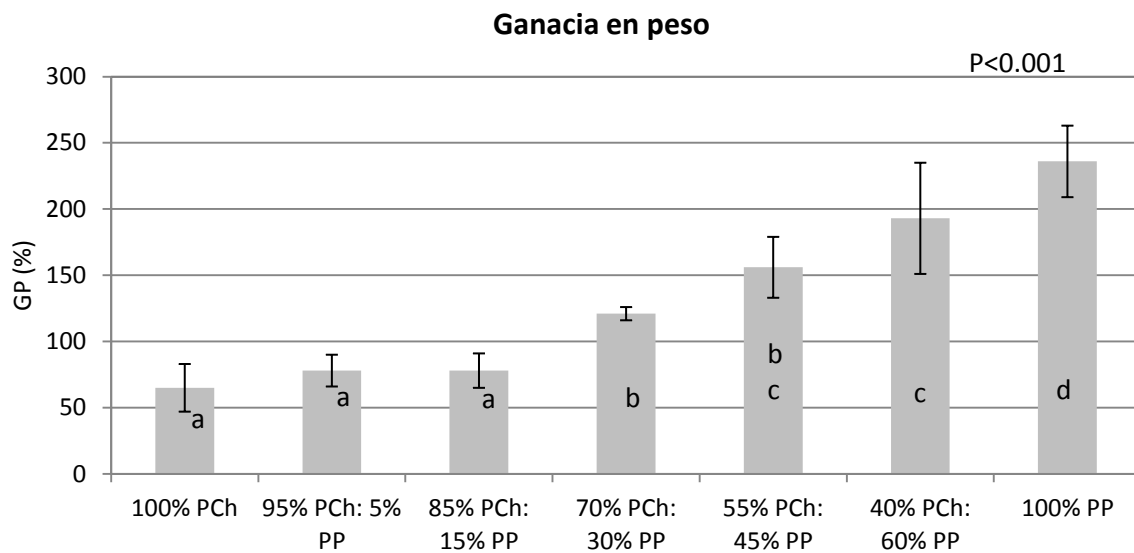


Figura 81. GP promedio (% en vivo, n=3). PCh es proteína de chícharo y PP es proteína de pescado. P es la probabilidad de Anova a los 29 días. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de Duncan ($\alpha= 0.05$).

Tabla 52. Evaluación de los parámetros zootécnicos a los 29 días en el bioensayo de contribuciones del experimento 11.

	Deficiente		Chícharo		verde del		95% PCh:		85% PCh:		70% PCh:		55% PCh:		40% PCh:		100% proteína		ANOVA			
	Canadá 3		100% PP		15% PP		30% PP		45% PP		60% PP		de pescado		P=							
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS								
Peso	0.23	0.03	a	0.25	0.02	a	0.25	0.02	a	0.31	0.07	b	0.36	0.03	bc	0.41	0.06	c	0.47	0.04	d	<0.001
GP	64.8	17.8	a	78.2	11.9	a	77.5	12.5	a	121	5.32	b	156	22.9	bc	193	42.1	c	236	26.8	d	<0.001
TCE	1.71	0.36	a	1.99	0.23	a	1.97	0.25	a	2.74	0.09	b	3.23	0.31	bc	3.68	0.51	cd	4.17	0.28	d	<0.001
Suv	96.3	6.41		92.6	6.41		92.6	12.8		96.3	6.41		92.6	6.41		100	0.00		88.9	11.1		0.722
Biomasa	2.01	0.10	a	2.09	0.12	a	2.07	0.27	a	2.71	0.18	b	2.98	0.1	b	3.70	0.5	c	3.77	0.2	c	<0.001

El peso inicial de los animales fue 0.140 ± 0.030 g. P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha = 0.05$).

La tasa de crecimiento, tasa estimada de recambio metabólico y tiempo medio de residencia en el músculo de camarones alimentados con las dietas experimentales es presentada en la Tabla 53 y Figura 82. Debido a los diferentes orígenes ecológicos de la harina chícharo y de la harina de pescado muestran valores significativamente diferentes ($P < 0.001$) de $\delta^{15}\text{N}$ (1.5 ± 0.4 y 16.6 ± 0.1 ‰, respectivamente), lo que permitió la formulación de dietas isotópicamente contrastantes y esto a su vez promovió un amplio rango de cambios isotópicos en el tejido muscular. Estos cambios isotópicos facilitaron la estimación de la contribución dietaria y la determinación de la tasa metabólica de recambio del nitrógeno. A pesar del bajo contenido de proteína, las 7 dietas tuvieron una rápida influencia sobre los valores isotópicos del músculo de camarón y para el día 22 los animales de todos los alimentos evaluados ya habían alcanzado el equilibrio isotópico. Los valores $\delta^{15}\text{N}$ en el músculo de camarón cultivado con dietas de proteína mixta estuvieron estrechamente relacionadas con los valores isotópicos del nitrógeno dietario aportado por las diferentes proporciones de harinas de chícharo y pescado. Los factores de discriminación isotópica $\Delta^{15}\text{N}$ entre los animales y sus respectivas dietas fueron contrastantes. El factor de discriminación isotópica $\Delta^{15}\text{N}$ entre el tejido muscular del camarón y la dieta con 100% de proteína de pescado fue pequeña (0.5 ‰), mientras que el valor observado entre el tejido muscular del camarón y la dieta deficiente de chícharo verde 3 fue significativamente más grande (7.4 ‰). Los factores de discriminación $\Delta^{15}\text{N}$ en todos los tratamientos estuvieron altamente correlacionados ($r^2 = 0.94$) con el contenido de chícharo en las dietas.

La estimación del parámetro m por regresión lineal no iterativa (Hesslein *et al.*, 1993) indicó que las tasas metabólicas de recambio de nitrógeno en el tejido muscular del camarón presentaron alta variabilidad (0.014-0.078 d^{-1}) y los valores no estuvieron correlacionados con el contenido de chícharo en la dieta Figura 83. Las tasas de recambio del nitrógeno más elevadas corresponden a los camarones alimentados con 85PCh:15PP y 95PCh/5PP (0.078 y 0.062 día^{-1} , respectivamente), mientras que el valor más bajo (0.014 d^{-1}) se determinó en el músculo del camarón alimentado con 70PCh/30PP. Los tiempos residencia media de nitrógeno en el tejido de camarón se estimaron de 7.4 días (con la dieta de 85PCh/15PP) a 17.6 días (con la dieta de 70PCh/30PP).

Tabla 53. Tasas de crecimiento (k), tasas estimadas de recambio metabólico (m) y tiempos medios de residencia (t_{50}) en músculo de camarón *L. vannamei* cultivados con las dietas del experimento 11. La discriminación isotópica corresponde a las diferencias entre las dietas y el tejido muscular después de alcanzar el equilibrio ($\Delta^{15}\text{N}$).

	Deficiente		95% PCh:		85% PCh:		70% PCh:		55% PCh:		40% PCh:		100% proteína de		ANOVA							
	Chícharo verde del		5% PP		15% PP		30% PP		45% PP		60% PP		pescado			P=						
	\bar{x}	DS		\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS							
k (d^{-1})	0.017	0.004	c	0.020	0.002	c	0.020	0.003	c	0.027	0.001	b	0.032	0.003	ab	0.037	0.005	a	0.042	0.003	a	0.001
m (d^{-1})	0.053	0.011	a	0.062	0.008	a	0.078	0.024	a	0.014	0.013	b	0.021	0.006	ab	0.027	0.028	a	0.048	0.012	a	0.002
t_{50} (d)	10.1	2.2	ab	8.5	1	b	7.4	2.1	b	17.6	6	a	12.8	0.8	ab	11.3	4.5	ab	7.7	1.3	b	0.017
$\Delta^{15}\text{N}$ (‰)	7.4			6.3			6.1			3.6			3.2			3			0.5			

P es la probabilidad de Anova al considerar todos los tratamientos. Las letras en la misma línea indican conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha=0.05$).

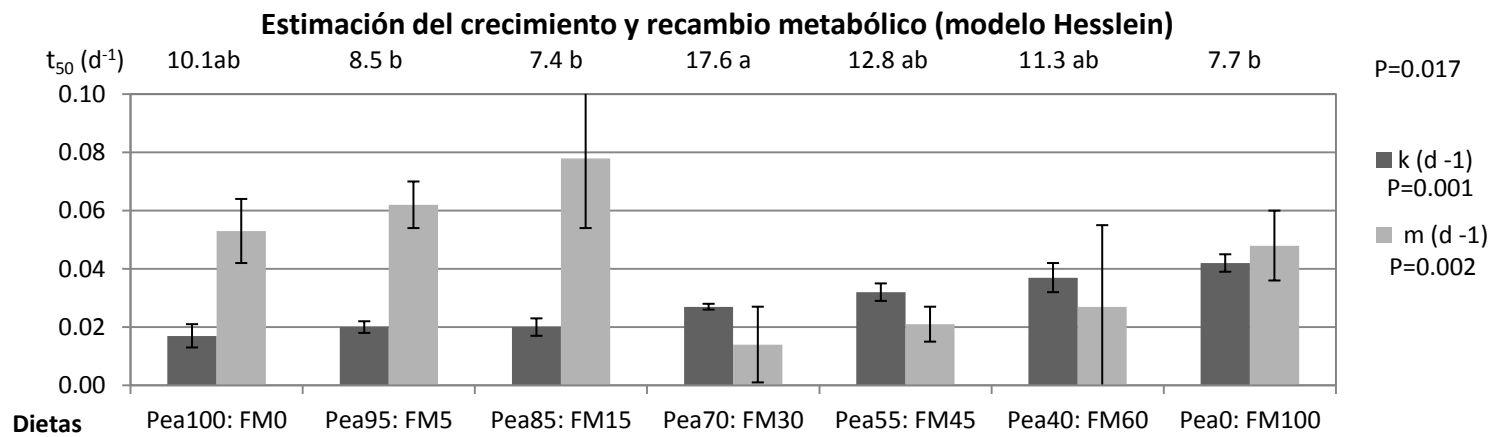


Figura 82. Comparación del crecimiento (k), recambio metabólico (m) y tiempo de residencia media del nitrógeno (t_{50}), obtenidos a partir del modelo Hesslein. P es la probabilidad de Anova. Las barras indican la desviación estándar y las letras conjuntos homogéneos definidos por la prueba de comparación múltiple por Duncan ($\alpha=0.05$).

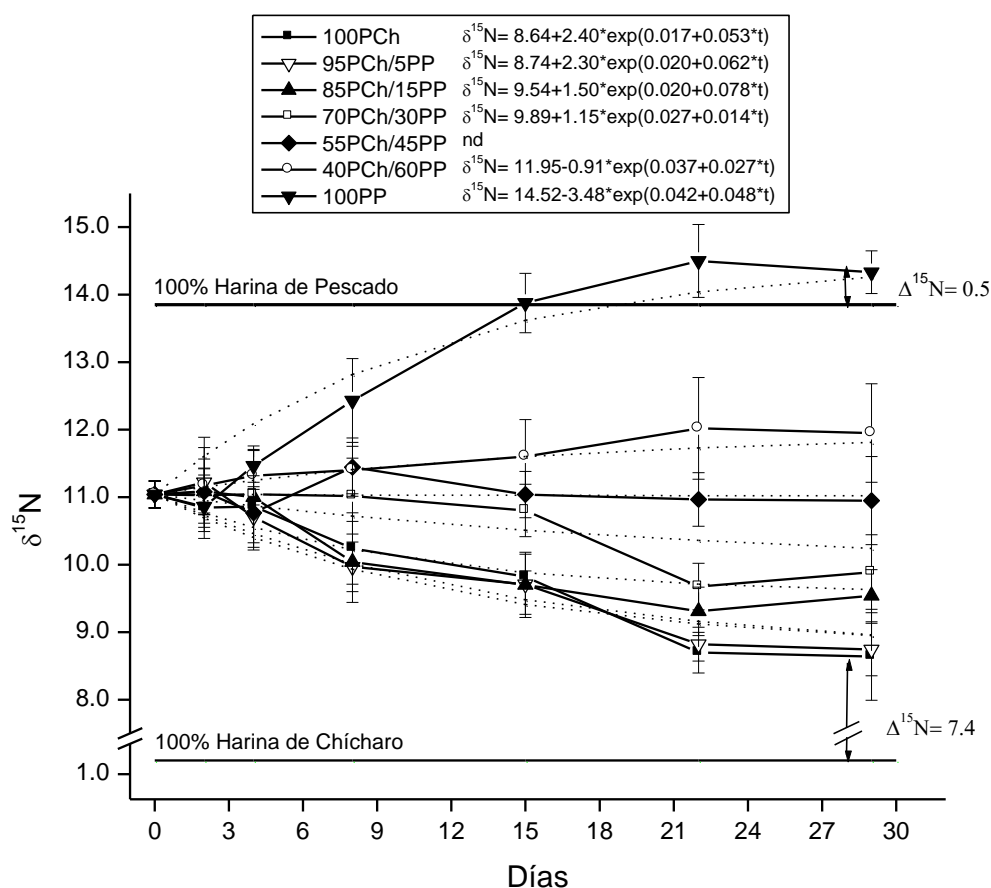


Figura 83. Cinéticas de los cambios en los valores del isótopo estable de nitrógeno (‰) en el músculo de *L. vannamei* al ser alimentados con las dietas del experimento 11, partiendo de una dieta de acondicionamiento. Los valores predichos mediante el modelo de Hesslein *et al.* (1993) se presentan en líneas punteadas. Las flechas representan los factores de discriminación isotópica entre el músculo de camarón y las respectivas dietas con 100% de proteína de pescado o de chícharo.

Los cambios isotópicos $\delta^{15}\text{N}$ durante el periodo experimental y su utilización en el modelo de mezclado isotópico indicaron que el nitrógeno de las harinas de chícharo y de pescado en las dietas donde se mezclaron tuvieron contribuciones al nitrógeno del

músculo del camarón muy semejantes a las esperadas, que corresponden a las proporciones en las que las dos dietas de base fueron mezcladas; con excepción de los camarones alimentados con la dieta 70PCh:30PP, donde la contribución del nitrógeno de chícharo hacia el músculo del camarón (78%) fue significativamente más elevada ($P=0.006$) que la proporción de nitrógeno en la dieta (Figura 84). La proporción de nitrógeno chícharo: pescado (54:46) otorgada en la dieta 55PCh/45PP fue muy semejante a la contribución estimada mediante el modelo de mezclado de 59:41.

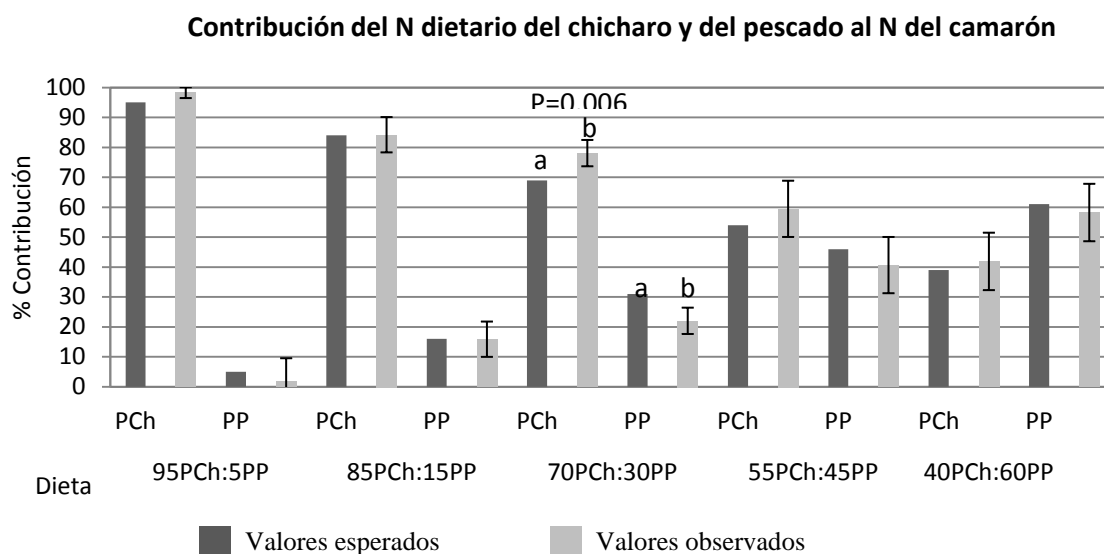


Figura 84. Las proporciones esperadas y observadas de nitrógeno en la que contribuyeron la harinas de chícharo y de pescado al nitrógeno en el músculo de *L. vannamei*. Las contribuciones se estimaron usando un modelo de un isótopo y dos fuentes ($n=18$). Las letras indican diferencias significativas y P la probabilidad de χ^2 de bondad de ajuste.

Al calcular la contribución de materia seca de cada ingrediente con base en las contribuciones de nitrógeno antes presentadas se obtuvieron valores muy cercanos a los esperados, con excepción de la dieta 70PCh:30PP. Las diferencias en magnitud entre las contribuciones de nitrógeno y materia seca se deben principalmente a que en la dieta a base de chícharo, este ingrediente se incluye en 85% y además de ser una fuente proteínica tiene un compartimento importante de carbohidratos; en tanto el pescado se incluye en 32% y su compartimento más importante corresponde a la proteína (72% bh).

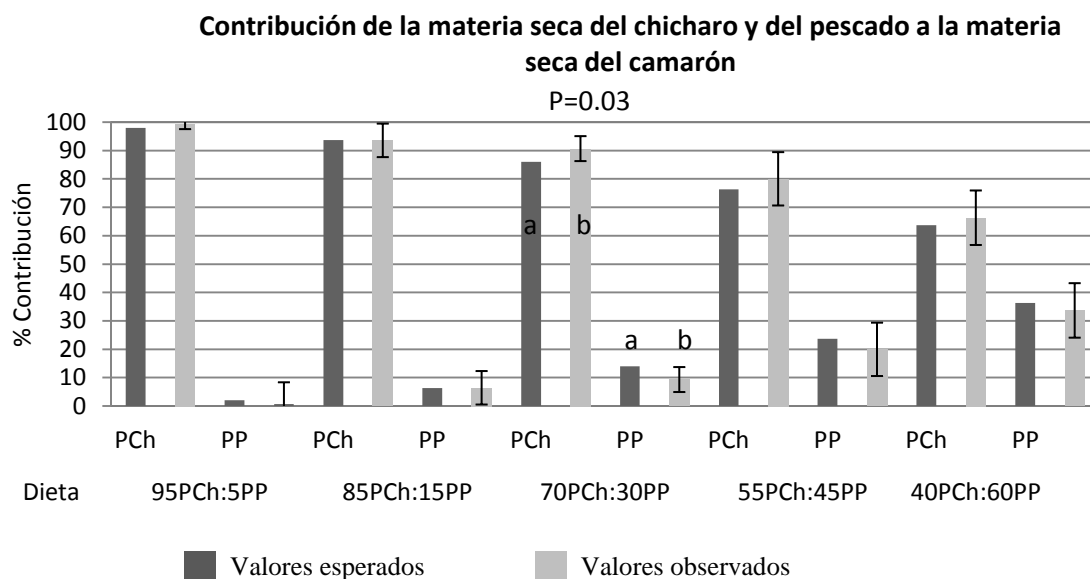


Figura 85. Las proporciones esperadas y observadas de materia seca en la que contribuyeron la harinas de chícharo y de pescado a la materia seca en el músculo de *L. vannamei*. Las contribuciones se estimaron a partir de las contribuciones de nitrógeno corregidas por las concentraciones de nitrógeno en los ingredientes (Fry, 2006) (n=18). Las letras indican diferencias significativas y P la probabilidad de χ^2 de bondad de ajuste.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento comercial deficiente

(Experimento 1)

7.1.1 Análisis químico de las dietas

Los niveles de 33-29.8% de proteína encontrados en la dietas del experimento 1 están dentro de los niveles recomendados para *L. vannamei* de alrededor de 30% (Akiyama *et al.*, 1991), y son mayores a los recomendados por Cruz *et al.* (2000) y Velasco *et al.* (2000) de proteína digestible (25%) debido a que la proteína de los ingredientes no es 100% digestible, pero son inferiores a los valores (35-40%) utilizados por la industria de alimentos para *L. vannamei* en México (Cruz-Suárez *et al.*, 2002). La dieta con inclusión teórica de 0.14% de MHA, solo presentó un contenido analizado de 0.10% de MHA, con lo cual el contenido de Met total se incrementó de 0.65 a 0.73% de Met total (1.93 a 2.17% de proteína), considerando la aportación teórica de HMTBA (84%). Por otro lado la dieta comercial, utilizada como control externo presentó menor contenido de proteína (29.8%) y de Met (0.53%) que las dietas experimentales (con 33% de proteína y 0.63% de Met) y los valores sugeridos para la industria (30% de proteína y 0.72 de Met) (Akiyama *et al.*, 1991).

7.1.2 Análisis físico de las dietas

La ABS de agua marina de la dieta deficiente en Met de soya 1 (93%) fue mayor que en la dieta suplementada con 0.14% de MHA (82%), probablemente debido a diferencias en el procesamiento del lote. Valores de ABS más altos pueden estar

asociados a una menor estabilidad del pelet, en función de que el agua es transportada de la superficie hacia el núcleo del pelet a través de las fibras filamentosas de los ingredientes (Akiyama *et al.*, 1991). Una ABS de agua mayor en la dieta deficiente en Met soya 1, podría estar relacionada con mayores pérdidas de materia seca, Met, Lys y Arg en comparación con los valores obtenidos para la dieta suplementada con 0.14% de MHA, en contraste la PPC y la PE no presentaron la misma relación. Los valores de PMS (17-21%), PPC (9-10%) y PE (22-24%) corregidos por sal para las dietas del experimento 1, fabricadas en Costamar, fueron mayores que los reportados para alimentos comerciales mexicanos (2-5%, 0-12% y 10% respectivamente) sin la corrección por sal (Cruz-Suárez *et al.*, 2002). Dominy y Lim (1991) han reportado PMS para alimentos comerciales asiáticos (5-7%) y alimentos experimentales fabricados industrialmente (7-12%) inferiores a los obtenidos en el presente experimento, al igual que la PMS (4-8%) reportada por Fox *et al.* (1995) en dietas extruidas para la determinación del requerimiento de Lys.

Ricque-Marie *et al.* (2006) encontraron en alimentos comerciales pérdidas de 25% para Met y Lys y de 20% para Arg en 60 minutos de inmersión, las cuales presentaron una tendencia semejante a las pérdidas de Met (37-41%), Lys (34-41%) y Arg (22-30%) con las dietas experimentales del presente experimento. Por otra parte Huai *et al.* (2009b) reportó la lixiviación de AA (método de Dominy y Lim, 1991) en una dieta extruida a base de harina de pescado y gluten, deficiente en Thr, encontrando pérdidas de Met, Lys y Arg (8.8, 6.7, 1.04% respectivamente) que resultan bajos en relación a los valores presentados anteriormente para las dietas del presente experimento. Lo antes reportado implica una pérdida de AA solubles exclusivamente de las proteínas intactas (i. e. pasta de soya, harina de trigo, harina de pescado, etc.). En oposición a los reportes técnicos de Novus International, los que consideran una baja solubilidad de MHA, se encontró una elevada PMHA (57%) en la dieta con 0.14% MHA, la que concuerda con la pérdida de HMTBA (44%) reportada por Fogle *et al.* (1999) en alimentos para camarón a base de pasta de soya (44%), harina de trigo (30%) y harina de pescado (15%) suplementado con Alimet, una presentación en líquido del análogo de Met.

Las dietas, deficiente en Met soya 1 y suplementada con 0.14% de MHA con contenidos de Met total de 0.65 y 0.73% respectivamente (1.93 y 2.17% de proteína) más elevados que el contenido de la dieta comercial de 0.53% (1.78% de proteína), produjeron crecimientos similares (GP 176-204%). Las TEP fueron inferiores por el mayor contenido de proteína de las dietas y su mayor consumo. De acuerdo a lo anterior una deficiencia de 20% de Met en la dieta deficiente en Met soya 1, de 9% en la dieta suplementada con 0.14% de MHA o de 26% en la dieta comercial con respecto a las recomendaciones para la industria de los camarones (Akiyama *et al.*, 1991) son capaces de producir el mismo rendimiento. En resumen, los alimentos con niveles de proteína de 29.8 a 33% y niveles de Met de 0.53 a 0.73% y de AAS de 1 a 1.17% no generan cambios significativos en el crecimiento y la sobrevivencia de los camarones que los consumieron, por lo que es posible que el requerimiento de Met total sea menor de 0.53%, con este tipo de dietas donde hay un alto aporte de Cys (0.51%) y de colina (aportada por ingredientes como HP, lecitina de soya, Aceite de pescado etc).

7.1.3 Resultados Zootécnicos

La falta de diferencia en los crecimientos producidos por las dietas experimentales, suplementada o no con MHA (0.10%) en el presente experimento contrastan con las mejoras en el crecimiento de *P. monodon* reportadas por Swick *et al.* (1995) con dietas incluyendo proporciones de 20:13 y 20:10 de pasta soya y harina de pescado cuando fueron suplementadas con 0.5% de MHA. Por otra parte los resultados del presente experimento concuerdan con los resultados reportados por Vazquez-Añon *et al.* (2004), donde usando una dieta 18% deficiente en Met (Akiyama *et al.*, 1991) a base de trigo duro (43%), pasta de soya (26%) harina de pescado (15%) y solubles de menhaden (5%), además de AA cristalinos (0.08% de Arg, 0.07% Lys y 0.06% de Thr) y suplementado con 0.1, 0.2 y 0.3% de MHA tampoco obtienen diferencias significativas en el peso de *L. vannamei* a los 28 días; además de que la GP (147%) en animales de 1.2g es inferior a la obtenida con la dieta deficiente en Met soya 1 (186%), aunque la considera típica en estudios de agua clara. En acuerdo con los resultados en el presente

experimento, Forster y Dominy (2006) con una dieta a base de proteína vegetales (48.6% de trigo entero, 29.3% de pasta de soya y gluten de trigo 4%) adicionada con AAC (0.5% de Arg, 0.5% de Lys-HCl, 0.2% de Thr y 1% Glu) obtiene una dieta 38% deficiente en Met con una GP de 243% que tampoco es significativamente diferente de la dieta suplementada con 0.6% de MHA, o de un control positivo comercial.

En una serie de bioensayos de crecimiento en tanques con producción natural Fox *et al.* (2006) evaluaron la eficiencia de DL-Met, HMTBA- unido a Mn, Ca, Cu y Zn y Polymet como fuentes de Met sobre dos dietas deficientes en Metionina. La primer dieta a base de pasta de soya (53.2%) y subproductos de ave (6%) presentó un deficiencia de 45% de Met (Akiyama *et al.*, 1991) y la segunda a base de pasta de soya (44.60%), subproductos de pollo (6%) y gelatina (5%) tuvo una deficiencia de 48% de Met. La primer dieta fue suplementada con 0.12% de cada una de las fuentes de HMTBA para quedar en una deficiencia de solo 32% de Met y la segunda dieta planteada fue suplementada con HMTBA-Cu para reducir gradualmente la deficiencia de Met (a niveles de 44, 40, 35 y 30%); los autores no encontraron diferencias significativas en el crecimiento (GP de 1500 y 740%) de los camarones tratados con las dietas deficientes y con las dietas suplementadas con alguna fuente de HMTBA, acorde con lo encontrado en el presente experimento.

Los consumos observados en las dietas deficientes en Met soya 1 con y sin suplementar con MHA presentaron diferencias con respecto a la dieta comercial, aunque las tres presentan pescado como atrayente y fueron producidas industrialmente, ya que como indica Biswas *et al.* (2007) las dietas a base de proteínas vegetales pueden estar escasas en atrayentes. En estudios anteriores (Swick *et al.*, 1995; Forster and Dominy, 2006) han encontrado que la suplementación de MHA incrementó la TCA a niveles de la dieta comercial, en contraste en el presente experimento se observaron valores de TCA semejantes entre las dietas experimentales y la dieta comercial. En estudios previos con la suplementación de MHA en alimentos para camarón no se ha monitoreado la TEP, ni la UNP. La TEP señala que con la cantidad de proteína ingerida con la dieta comercial, el crecimiento fue mayor y se asocia con la diferencia encontrada en el consumo. La UNP fue significativamente más baja (0.22) con la dieta deficiente en Met soya 1 y se

incrementa en la dieta comercial por contener menos proteína (0.3) con la suplementación del 0.1% de MHA indicando un incremento en la eficiencia de retención de proteína.

Los diferentes trabajos publicados (Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006), donde se evaluó la MHA como aditivo para cubrir los requerimientos de Met, han tenido dificultades para mostrar efectos positivos de la suplementación sobre el crecimiento, posiblemente como consecuencia de una sobreestimación de los requerimientos de Met utilizados para formular. En otros estudios (Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006) la MHA también ha demostrado tener un efecto atrayente, aumentando el consumo del alimento y en ocasiones la TCA.

7.2 Efecto de hidroximetil análogo de Met-Ca en un alimento experimental deficiente

(Experimento 2)

7.2.1 Análisis químico de las dietas

Los niveles de 30% de proteína elegidos y encontrados en las dietas deficientes en Met soya 2 y suplementada con 0.36% de MHA en el presente experimento fueron 3 puntos menores a los niveles de las dietas experimentales del experimento 1. Sin embargo se encuentran dentro de los niveles recomendados de proteína para la industria de los alimentos para *L. vannamei* de alrededor de 30% (Akiyama *et al.*, 1991); con valores de proteína digestible mayores a los reportados por Cruz *et al.* (2000) y Velasco *et al.* (2000) de proteína digestible (25%). Pero inferiores a los valores (35-40%) utilizados por la industria de alimentos para *L. vannamei* en México (Cruz-Suárez *et al.*, 2002). La dieta con inclusión teórica de 0.36% de MHA no fue analizada en MHA, debido a que en el experimento anterior se consideró que la inclusión teórica es muy semejante al contenido analizado en la dieta, adicionalmente en esta ocasión la fabricación de las dietas se realizó a escala laboratorio y no industrial como en el experimento previo. Considerando

la inclusión teórica de MHA en la dieta y el aporte teórico de HMTBA (84%) el contenido de Met total se incrementó de 0.44 a 0.74% de Met total (1.47 a 2.48% de proteína).

7.2.2 Análisis físico de las dietas

La ABS de las dietas experimentales elaboradas en el laboratorio en el presente experimento fueron elevadas (262%) en comparación con la ABS (85%) de las dietas experimentales de fabricación industrial en el experimento anterior. La extrusión de las dietas en un molino cárnico, no genera la misma textura del pelet con respecto a un proceso de peletizado industrial y produce una textura más blanda en los pelets, lo que resulta en mayor consumo por el camarón (Cruz-Suárez *et al.*, 2002). El incremento en la ABS de agua de las dietas deficiente en Met soya 2 y adicionada con 0.36%MHA no se correlacionó con mayores pérdidas por lixiviación de materia seca, Met, Lys y Arg en comparación con los valores obtenidos para las dietas experimentales previas, debido a que los valores de PMS fueron calculados sin corrección por sales.

Los valores de PMS (6.9%) en las dietas del presente experimento fueron mayores que las reportadas para alimentos peletizados comerciales mexicanos (2-5%) (Cruz-Suárez *et al.*, 2002) y menores a las reportadas en dietas experimentales a base de chícharo y pescado de 11% (Cruz-Suarez *et al.*, 2001), usando la misma metodología de lixiviación. Dominy y Lim (1991) han reportado PMS para alimentos comerciales asiáticos (5-7%) y alimentos experimentales fabricados industrialmente (7-12%) semejantes a los valores obtenidos en el presente experimento, a su vez acorde con lo encontrado por Fox *et al.* (1995) con dietas extruidas para la determinación del requerimiento de Lys.

Las dietas del presente experimento presentaron PMet (22-24%), PLys (55%) y PArg (16-23%) inferiores a las obtenidas en el experimento previo (37-41% de PMet, 34-41% de PLys y 22-30% de PArg) donde la lixiviación fue corregida por el contenido residual de sales. Por otra parte las PMet y PArg en las dietas experimentales del presente

experimento fueron semejantes a las reportadas por Ricque-Marie *et al.* (2006), aunque la PLys fue dos veces mayor (25 vs. 55%). En contraste con las dietas deficientes del presente experimento, Lim (1993) reportó valores más bajos de PMS, PMet y PArg (8, 8 y 11% respectivamente), los que corresponden con las pérdidas de Met, Lys y Arg (8.8, 6.7, 1.04% respectivamente) descritas por Huai *et al.* (2009b) en una dieta extruida a base de harina de pescado y gluten, deficiente en Thr (método de Dominy y Lim, 1991). Los resultados de lixiviación de AA antes reportados implican una pérdida de AA solubles exclusivamente de las proteínas intactas (i. e. pasta de soya, harina de trigo, harina de pescado, etc.).

7.2.3 Resultados Zootécnicos

La dieta deficientes en Met soya 2 con un contenido de Met total de 0.44% (1.47% de proteína) al ser suplementada con 0.36% de MHA llegó a un contenido de 0.74% (2.48% de proteína) cubriendo el nivel de 0.72% de Met (2.4% de proteína) recomendado para la industria (Akiyama *et al.*, 1991). Sin embargo, esto no mejoró el crecimiento pero si incrementó el consumo de la dieta significativamente. Las dietas del experimento anterior produjeron un crecimiento semejante (TCE de 3.8) al del presente experimento (TCE de 3.94); lo que apunta a que una deficiencia de 20% o de 9% de Met con las dietas experimentales en el experimento 1 o de 39% con la dieta deficiente en Met soya 2 soporta un crecimiento semejante al de una dieta completa con 104% de valor recomendado para la industria como la suplementada con 0.36% de MHA. Los resultados de TEP (1.6) y UNP (0.27) de las dietas deficiente en Met soya 1 y suplementada con 0.36% MHA no presentaron diferencias como en el experimento 1 porque las dietas fueron isoproteicas; por otra parte el consumo, a diferencia del experimento 1 presentó un incremento con la suplementación de 0.36%MHA, efecto ya reportado por Fox *et al.* (2006) lo que también ocurre en el experimento 1.

Los crecimientos (GP de 294%) semejantes entre las dietas experimentales con 49% de pasta de trigo, 30% de trigo y 10% de aislado de soya, suplementada o no con

MHA (0.36%) en el presente experimento contrastan con los incrementos en el crecimiento de *P. monodon* encontrados por Swick *et al.* (1995) en dietas con proporciones de 20:13 y 20:10 de pasta soya y harina de pescado cuando fueron suplementadas con 0.5% de MHA. Por otra parte los resultados del presente experimento concuerdan con los reportados por Vazquez-Añon y Giesen (2004), donde usando una dieta 18% deficiente en Met (Akiyama *et al.*, 1991) a base de trigo duro (43%), pasta de soya (26%) harina de pescado (15%) y solubles de menhaden (5%), además de AAC (0.08% de Arg, 0.07% Lys y 0.06% de Thr) y suplementar con 0.1, 0.2 y 0.3% de MHA no obtiene diferencias en el peso de *L. vannamei* a los 28 días; además de que la GP (147%) en animales de 1.2g es inferior a la obtenida con las dietas deficientes en Met soya en el presente experimento (294%), aunque la considera típica en estudios de agua clara. También concuerdan los resultados en el presente experimento, con los resultados de Forster y Dominy (2006) con una dieta a base de proteínas vegetales (48.6% de trigo entero, 29.3% de pasta de soya y gluten de trigo 4%) adicionada con AAC (0.5% de Arg, 0.5% de Lys-HCl, 0.2% de Thr y 1% Glu) obtiene una dieta 38% deficiente en Met (semejante al 39% de la dieta deficiente en Met soya2) con una GP de 243% que no es diferente significativamente (ANOVA) de la dieta suplementada con 0.6% de MHA, o de un control positivo comercial. Aunque estos últimos autores aplicando un análisis de contrastes ortogonales forzan a encontrar diferencias significativas.

En una serie de bioensayos de crecimiento en tanques con producción natural Fox *et al.* (2006) evaluaron la eficiencia de DL-Met, HMTBA- unido a Mn, Ca, Cu y Zn y Polymet como fuentes de Met sobre dos dietas deficiente en Met (45 y 48% respectivamente) incluso mayores a la deficiencia en Met (39%) alcanzada en el presente experimento con la dieta de soya 2. La primer dieta fue formulada a base de pasta de soya (53.2%) y subproductos de ave (6%) y la segunda a base de pasta de soya (44.60%), subproductos de pollo (6%) y gelatina (5%). La primer dieta fue suplementada con 0.12% de cada una de las fuentes de HMBTA para quedar en una deficiencia de solo 32% de Met y la segunda dieta planteada fue suplementada con HMTBA-Cu para reducir gradualmente la deficiencia de Met (a niveles de 44, 40, 35 y 30%); sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento (GP de 1500 y 740%) de los camarones tratados con las dietas deficientes y con las dietas suplementadas con alguna

fuentes de HMTBA, de acuerdo con lo encontrado en el presente experimento. Lo antes expuesto podría sugerir que en dietas a base de proteínas de trigo y soja con un contenido de Met de 0.44% (1.47% de la proteína) puede soportar un crecimiento adecuado en *L. vannamei*, semejante a los datos reportados por Fox *et al.* (2006).

La ausencia de una respuesta positiva con la suplementación de diferentes niveles de MHA o HMTBA en los experimentos 1 y 2 del presente trabajo, así como en otros estudios (Fox *et al.*, 1994; Swick *et al.*, 1995; Forster and Dominy, 2006) con dietas deficientes en Met (de hasta 48% del valor recomendado por Akiyama *et al.*, 1991); la falta de un estudio cuantitativo donde se describa la cantidad relativa del hidroxianálogo que es metabolizado en L-Met para camarón, como lo reportado para pollos (Dibner and Ivey, 1991; Dibner, 2003); además de la PMHA de 57% encontrada en el experimento 1, hacen suponer que la Met no es el primer AA limitante de la dieta o que el hidroxianálogo (HMTBA) MHA no es una fuente de Met estable o que incluso no esté realmente disponible para cubrir el requerimiento de Met en camarón, mediante un estudio de dosis respuesta.

7.3 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)

Las dietas del presente experimento mostraron PMS (11%) que corresponden con los valores reportados en otros trabajos, donde la fabricación y la metodología de lixiviación son semejantes (Cruz-Suarez *et al.*, 2001). Por otra parte los valores de PMS de las dietas encapsuladas 1 sin pos-acondicionar y deficiente en Met soja 3 se asemejan a los valores encontrados en las dietas del experimento 2 del presente trabajo (7%).

Las PMet calculadas a partir del alimento lixiviado y el contenido en el agua de lixiviación fueron consistentes, lo que hace suponer que toda la Met libre aportada por la Met encapsulada se solubilizó en el agua. Los valores de PMet en la dieta encapsulada 1 fueron superiores a los valores de PMet (10%) presentados por Alam *et al.* (2005) en una dieta a base de aislado de soja (45%) y calamar (15%) suplementada con 1.21% de L-Met libre o encapsulada, pero el método y la forma usada para calcular el % de PMet

puede ser el origen de la diferencia. Los valores de PMet de la dieta encapsulado 1 sin pos-acondicionar concuerdan con las PMet obtenidas en el experimento 2 (23-24%) y el valor (25%) reportado por Ricque-Marie *et al.* (2006), donde la PMet proviene de las fuentes de proteínas intactas usadas en la formulación de la dieta. El encapsulamiento de DL-Met en agar-agar fue favorable para mejorar la estabilidad y para la determinación del requerimiento de Met, pero los procesos de postcondicionamiento y la encapsulación con el doble de agar no fueron favorables.

7.4 Perfil de AA de carcas de *L. vannamei* como patrón de referencia (Experimento 4)

El perfil de AA en el carcas de camarón fue consistente en las cuatro condiciones de cultivo del experimento 4, a pesar de que el origen y peso de las pos-larvas de camarón fueron diferentes, probablemente debido a que todos los camarones fueron colectados en la etapa de juveniles.

El patrón de AA de referencia de *L. vannamei* obtenido en el presente estudio está bien correlacionado con la mayoría de los perfiles reportados en la literatura (Akiyama *et al.*, 1991; Lim, 1993; Forster *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2006), excepto por los subproductos de camarón (Huai *et al.*, 2009a), y en especial el perfil de músculo de camarón reportado por Sriket *et al.* (2007).

Los valores recomendados por Akiyama *et al.* (1991) que se encuentran sobre estimados en relación al patrón de AA de referencia de *L. vannamei* fueron Met, Met+Cys and Thr; sin embargo Cys, Lys, Arg, Ile, Leu, Val, His and Phe están subestimados (7-20%); siendo Lys (20%) y Arg (17%) los AA más subestimados, los cuales usualmente han sido descritos como dos de los principales AA limitantes, debido a su escasas en los ingredientes dietarios (Guillaume, 1997; Wilson, 2003).

Los perfiles de *L. vannamei* reportados para animales de 1.56 and 18g (Tacon *et al.*, 2002) y de peso desconocido (Forster *et al.*, 2002) muestran una elevada correlación ($R^2= 0.959$, $R^2=0.95$ y $R^2=0.949$ respectivamente) con el patrón de AA de referencia de

L. vannamei determinados en el presente estudio. El perfil descrito por Tacon *et al.* (2002) fue el más cercano, donde las diferencias fueron de 10% o menos para Met, Cys, Ile, Leu, Val, His, Gly, Ala, Asp and Glu, mientras Thr, Ser y Pro estuvieron sobrestimados en 11-20%. Los AA Arg y Phe estuvieron sobrestimados para camarones de 1.58g en 20 y 40%, en tanto las sobrestimaciones fueron de 40 and 20% para los mismos AA con camarones de 18.4g. Únicamente la Lys resultó subestimada en 20% con ambas tallas de camarón. Por otra parte el perfil de AA reportado por Forster *et al.* (2002) fue subestimado entre 7 y 34%, donde los valores más cercanos fueron para Met (93%), Met+Cys (88%) y Arg (87%), en contraste con Phe (66%).

El patrón de AA de referencia de *L. vannamei* y el perfil de AA de músculo de cola de la misma especie reportado por Lim *et al.* (1993) estuvo altamente correlacionado ($R^2=0.954$ y $P=0.000$), en contraste el perfil para músculo de cola reportado Sriket *et al.* (2007) no se correlacionó. Sin embargo, el perfil de AA de Sriket *et al.* (2007) mostró valores semejantes de Thr, Val, His, Ser, Ala con diferencias menores al 15%, aunque el resto de los AA mostró diferencias entre 40 y 120%. Los análisis de AA son difíciles de estandarizar y aún más difíciles de homologar entre laboratorios. Las causas se han asociado a: el pre tratamiento de las muestras, la técnica analítica, el agente hidrolizante (Peñaflorida, 1989), además de la rápida evolución tecnológica de los equipos analíticos.

El patrón de AA de referencia de *L. vannamei* presentó la mejor de las correlaciones ($R^2= 0.961$) con el límite superior de los valores para harinas de camarón reportado por Hess *et al.* (2006). Los valores del límite superior de AA en las harinas para camarón son semejantes al del patrón de AA en *L. vannamei* para Lys, Arg y Asp, el resto de los AA estuvo sobreestimado; los valores más próximos con diferencia de 15% o menor fueron Thr, Ile, Leu, Val, His, Gly, Ser, Pro and Ala, mientras los más distantes fueron Met y Phe en 20% y Cys en 40%.

Los perfiles de AA de la cabeza de camarón (Hess *et al.*, 2006) y el límite inferior de los valores de harinas de pescado (Huai *et al.*, 2009a) mostraron menores correlaciones ($R^2= 0.861$ and $R^2= 0.843$) con el patrón de AA de referencia de *L. vannamei* que el límite superior de harinas de camarón, el cuerpo o la cola de *L. vannamei* de camarón ($R^2>0.949$); sin embargo hubo una alta correlación entre los

valores del perfil de AA de la cabeza de camarón y el límite inferior de las harinas de camarón ($R^2 = 0.903$). Lo anterior permite plantear la idea de que las harinas colectadas por Hess *et al.* (2006) son una mezcla de harinas de subproductos de camarón y de harinas de camarón entero, con base en el perfil y los porcentajes de recuperación (AA totales / proteína cruda) de los AA; donde bajos valores de recuperación están asociados a un alto contenido de quitina en los subproductos de camarón, el componente más abundante en la cabeza de camarón (Cao *et al.*, 2009). En concordancia a lo antes planteado, Akiyama *et al.* (1991) identificó amplias variaciones en las harinas de camarón. Las diferencias entre el límite inferior de las harinas de camarón y la harina de cabeza de camarón se asocian en parte a las diferentes especies usadas para fabricar las harinas de camarón, incluyendo *L. vannamei*.

El perfil de AA (% de la proteína) propuesto como patrón de referencia para *L. vannamei* se apoya en los perfiles encontrados en la literatura para cuerpo entero y músculo de *L. vannamei*, harinas y cabeza de camarón, así como en las recomendaciones para la industria excepto por el reportado por Sriket *et al.* (2007). Los datos para cuerpo entero (Forster *et al.*, 2002) y cabeza de camarón (Huai *et al.*, 2009a) fueron en general menores mientras los del límite superior de las harinas de camarón estuvieron sobre estimados. El valor de la Met en el patrón de AA de *L. vannamei* fue de 2%, aunque las recomendaciones para la industria y la cola de camarón mostraron valores sobreestimados (16%). La Cys presentó un amplio rango de valores (0.75-1.03%), pero la suma de Met+Cys siempre fue cercana 3%. La mayoría de los valores de Lys han sido subestimados al nivel de las recomendaciones para la industria (5%) en comparación al patrón de AA de referencia *L. vannamei* (6.64%) que fue consistente con el límite superior de las harinas de camarón, pero sobreestimado en la cola de camarón. La mayoría de los perfiles tuvieron valores de Thr de 4%, pero el nivel recomendado para la industria fue consistente con el del patrón de AA de referencia (3.6%). La Arg presentó un amplio rango de valores (5-10%), igual que la Leu (5-7%). El nivel de Arg en el patrón de AA de referencias fue moderado (7%), estrechamente relacionado con el nivel del límite superior de harinas de camarón y la relación Arg/Lys fue cercana a 1 como se recomienda para la industria. El valor propuesto para Leu fue de 6.55%. Los valores de Ile fueron de 3.5-4.14%, donde el valor más bajo corresponde al propuesto.

Los contenidos de Val fueron del rango de 3.7-4.75%, pero para la cabeza de camarón estuvo altamente sobreestimado (6.4%). Los contenidos de His fueron de 2.1-2.28%. Los valores de Phe estuvieron dispersos en un rango de 2.8- 6.4%, donde el valor propuesto fue de 4%, cercano a las recomendaciones para la industria y al músculo de camarón. Los AAD indicaron una amplia variedad de valores, probablemente debido a que estos están envueltos en el equilibrio metabólico. Los valores para Gly, Ser, Pro y Glu fueron de 7-8%, 3.66-4.25%, 6.34-7.28% y 13.83-15.03% respectivamente. Los rangos en Ala (5.7%) y Asp (9.4-9.9%) fueron estrechos, como los encontrados en los AAI (Tabla 54).

Los valores del requerimiento de Lys estimados para *L. vannamei* (Fox *et al.*, 1995) con base en la adición de Lys cristalina (4.49%CP) o de Lys ligada a gluten de trigo (5.19%) estarían subestimados en un 22 y 32% con respecto al patrón de AA referencia de *L. vannamei*; mientras que el requerimiento de Thr (Huai *et al.*, 2009b) estaría subestimado en un 5%. De acuerdo a lo anterior y utilizando el concepto de proteína ideal, el patrón de AA de referencia de *L. vannamei* se ajustaría mejor al requerimiento de Thr que al requerimiento de Lys determinados para esta especie.

El patrón de AA propuesto está altamente correlacionado con los valores recomendados por Akiyama *et al.* (1991) ($R^2 = 0.955$), con el límite superior de los valores de harinas de camarón reportados por Hess *et al.* (2006) ($R^2 = 0.961$), con los valores del cuerpo entero de la bibliografía reportada por Forster *et al.* (2002) ($R^2 = 0.959$) y Tacon *et al.* (2002) ($R^2 = 0.951$; $R^2 = 0.949$) y con los valores de músculo de cola de camarón reportados por Lim (1993) ($R^2 = 0.954$). Sin embargo el límite inferior de los valores de la harinas de camarón reportados por Hess *et al.* (2006) ($R^2 = 0.861$) y los de la cabeza de camarón reportados por Huai *et al.* (2009a) ($R^2 = 0.843$) no se correlacionaron muy bien con el patrón de AA propuesto. Todas las correlaciones son altamente significativas ($P < 0.001$). El perfil del músculo de cola de camarón reportado por Sriket *et al.* (2007) fue diferente ($P = 0.309$) al resto y no se correlacionó ($R^2 = 0.069$). Por otra parte los valores de la cabeza de camarón (Huai *et al.*, 2009a) estuvieron mejor correlacionados ($R^2 = 0.903$) con los valores del límite inferior de la harinas de camarón (Hess *et al.*, 2006) que con los valores del límite superior ($R^2 = 0.847$).

Tabla 54. Perfil de AA propuesto como patrón de referencia para el cuerpo entero de *L. vannamei* (% PC), recomendaciones para la industria, límites superior e inferior de AA (intervalo de confianza = 95%) en harinas de camarón, además de valores de AA reportados para el cuerpo entero, músculo de la cola y cabeza de camarón. Los valores fueron correlacionados respecto al perfil de AA propuesto como patrón (coeficiente de determinación, R²).

	Patrón de aminoácidos		Recomendaciones para la industria (Akiyama <i>et al</i> , 1991)	Valores de harina de camarón (Hess <i>et al</i> , 2006)**		Cabeza de camarón (Huai <i>et al</i> , 2009)	Cuerpo entero de camarón			Músculo de cola de camarón	
	\bar{x}	DS		Límite inferior	Límite superior		1.58g (Tacon <i>et al</i> , 2002)*	18.4g (Tacon <i>et al</i> , 2002)*	(Forster <i>et al</i> , 2002)	(Lim, 1993)	(Sriket <i>et al</i> , 1993)*
Met	2.07	0.12	2.4	1.11	2.47	1.93	2.1	2.12	1.92	2.96	4.46
Cys	0.98	0.06	1.2	0.56	1.38	1.03	0.93	1.03	0.75	--	1.88
Met+Cys	3.04	0.14	3.6	1.8	3.74	2.96	3.03	3.16	--	--	6.34
Lys	6.64	0.11	5.3	3.57	6.61	4.8	5.24	5.33	4.84	7.32	2.16
Thr	3.59	0.11	3.6	2.96	3.92	3.35	4.25	4.03	2.52	3.93	3.88
Arg	6.98	0.33	5.8	3.73	6.75	4.95	8.27	9.58	6.1	8.54	12
Ile	3.77	0.08	3.5	2.85	4.25	3.26	4.08	4.13	2.65	4.14	8.28
Leu	6.55	0.17	5.4	4.51	7.21	5.43	7.22	7.13	4.69	7.39	10.83
Val	4.37	0.13	4	3.93	4.75	6.4	4.54	4.57	3.1	4.32	3.7
His	2.28	0.06	2.1	1.38	2.6	1.63	2.27	2.18	1.62	2.21	2.29
Phe	4.29	0.08	4	2.21	6.37	4.04	5.94	5.06	2.81	4.14	6.75

Continuación tabla 54

	Patrón de aminoácidos		Recomendaciones para la industria (Akiyama <i>et al.</i> , 1991)	Valores de harina de camarón (Hess <i>et al.</i> , 2006)**		Cabeza de camarón (Huai <i>et al.</i> , 2009)	Cuerpo entero de camarón			Músculo de cola de camarón	
	\bar{x}	DS		Límite inferior	Límite superior		1.58g (Tacon <i>et al.</i> , 2002)*	18.4g (Tacon <i>et al.</i> , 2002)*	(Forster <i>et al.</i> , 2002)	(Sriket <i>et al.</i> , 1993)*	(Lim, 1993)
Gly	7.14	0.36	--	3.69	7.97	4.35	6.99	7.94	--	--	2.99
Ser	3.66	0.08	--	2.78	4.22	3.47	4.25	4.13	--	--	3.53
Pro	6.34	1.09	--	2.45	6.65	3.29	7.28	6.8	--	--	13.26
Ala	5.79	0.32	--	4.08	6.3	3.89	5.65	5.6	--	--	5.5
Asp	9.67	0.2	--	7.08	9.4	8	9.9	9.85	--	--	5.85
Glu	13.83	0.25	--	7.83	16.39	11.56	15.03	14.69	--	--	5.16
Trp	--	--	0.8	0.68	1.26	--	0.93	0.92	0.69	0.68	--
Tyr	--	--	--	--	--	3.38	4.25	4.13	2.58	--	--
Tau	--	--	--	--	--	--	0.87	0.76	0.56	--	--
TAA	91	1.7	41.4	55.5	98.4	74.8	100	100	--	45.6	92.5
R2	--	--	0.955	0.861	0.961	0.843	0.959	0.951	0.949	0.954	0.069

* Expresados en porcentaje de la suma de AA.

** Los valores de harina de camarón se calcularon a partir de N=15, excepto para Trp donde N=8 y con un intervalo de confianza de 95%.

7.5 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)

7.5.1 Análisis químico de las dietas

Las dietas experimentales fueron isoproteicas e isoenergéticas y los niveles de AA analizados correspondieron con los esperados. De acuerdo con lo reportado por Biswas *et al.* (2007) se confirmó que cuando un alimento es formulado a base de soya, su perfil de AA presenta diferencias importantes en el contenido de algunos AAI al compararlos con el perfil de AA del carcas del camarón (*L. vannamei*), con el alimento de base formulado en este trabajo se encontró un menor contenido o deficiencia (22%) de Met y de Lys (3%) con respecto al carcas de camarón; y un contenido menor de Met (33%) y un exceso de Lys (22%) considerando las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991). Esto significa que en el primer caso como los dos AA estarían en menor concentración que la referencia, cualquiera de ellos podría ser el primer limitante, lo que justificaría esperar una respuesta positiva con la suplementación de ambos AA. Mientras que en el segundo caso solo la Met es deficiente (por ello durante mucho tiempo la Met se ha considerado como el primer limitante en este tipo de fórmulas), lo que justificaría esperar solo una respuesta positiva en el caso de la Met y ausencia de respuesta o respuesta negativa por el exceso de Lys.

Por otro lado considerando los requerimiento de Met y Lys reportados para *P. monodon* por Millamena *et al.* (1996a; 1998) (2.4 y 5.2% de la proteína) y de Lys reportado para *L. vannamei* por Fox *et al.* (1995) (5.19% de la proteína), que son muy parecidos a los recomendados por Akiyama *et al.* (1991), el alimento control en este estudio se consideraría deficiente en Met y excedente en Lys.

De acuerdo con los resultados de los análisis de los AA de los alimentos y con el diseño experimental, la adición de Met o Lys permitió cubrir o exceder la deficiencia en Met y Lys presentada en la dieta de base (control) en diferentes proporciones según la referencia de requerimiento utilizada. Así tenemos que al suplementar las dietas con

0.4% de Met encapsulada (0.91 de Met total en la dieta, 2.94% de proteína) se cubrió y excedió el contenido de Met de camarón en 42% y la recomendación de Akiyama *et al.* (1991) en un 23%. Por su parte, las dietas suplementadas con 0.45, 0.9 y 1.35% de Lys encapsulada (2.45, 2.9 y 3.05% de Lys total en la dieta, 7.9, 9.35 y 9.84% de proteína) cubrieron y excedieron el contenido de Lys del camarón en un 19 a un 48% y excedieron la recomendación de Akiyama *et al.* (1991) en un 49 a un 86%. Por otra parte el contenido de Met (0.72%) en el alimento comercial cubrió en exceso (16%) el contenido de Met con respecto al carcas de camarón y cubrió sin exceso la recomendación de Akiyama *et al.* (1991), mientras que el contenido de Lys (2.08) cubrió al 100% el valor de camarón y presentó un exceso de 15% con respecto a la recomendación de Akiyama *et al.* (1991). De tal manera que después de analizar los alimentos se confirmó la deficiencia en Met y Lys en la dieta control con respecto al carcas y la presencia de los AAC en las concentraciones suplementadas, así como la pertinencia de la composición de AA en el alimento comercial.

7.5.2 Análisis físico de las dietas

La adición de AA encapsulados incrementó el contenido de agar y con ello la capacidad de retención de agua de las dietas, debido a que es un polisacárido hidrocoloide (Cruz-Suárez *et al.*, 2006).

Después de 60 minutos de inmersión en el agua los alimentos presentaron una PMS de alrededor del 15% y PPC de 12 %, aceptable (excepto la dieta 3), aunque un poco mayor a lo reportado para alimentos utilizados en estudios relacionados (Dominy and Lim, 1991; Fox *et al.*, 1995; Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Cruz-Suárez *et al.*, 2002).

Por el contrario en el caso de los AA las pérdidas por lixiviación fueron muy importantes del orden del 97% en el caso de los AA suplementados, a pesar de haber sido encapsulados en agar, y del 20% en AA provenientes de los ingredientes, a partir de los 15 minutos de inmersión. Estas pérdidas fueron muy superiores a las reportadas por Lim (1993) para Met y Lys suplementadas en forma libre (53 y 30%), a las reportadas por

Alam *et al.* (2004b) para una mezcla de AA encapsulados en agar (2.4%) y Alam *et al.* (2005) para Met y Lys encapsuladas en CMC (8 y 6%). Estas discrepancias se pueden explicar por las grandes diferencias que existen en las fórmulas, en los métodos de encapsulación y lixiviación, pero especialmente por la diferencia en las ecuaciones utilizadas para el cálculo de porcentaje de pérdida de nutrientes que aplican estos grupos de investigación. Cabe señalar que la metodología de lixiviación que nosotros aplicamos trata de emular las condiciones del pellet en el acuario a través del empleo de un baño de agua con agitación, lo cual se ha validado al encontrar tasas de lixiviación similares. Así mismo, nuestro cálculo de la pérdida de nutrientes toma en cuenta el cambio en la materia seca que se da en cada tiempo de lixiviación, lo cual no es considerado por el resto de los autores y que se manifiesta en valores de pérdidas de nutrientes por lixiviación bajos y subestimados (Risque-Marie *et al.*, 2006).

Alam *et al.* (2005) presentan la tasa de lixiviación (15min) de sus encapsulados en un estudio de requerimiento de AA, incluidos en una dieta a base de aislado de soya y calmar peletizada en un molino cárnico. Estos investigadores reportaron una reducción del 30% en la P de AA con la encapsulación en CMC lo cual no se logró en el presente estudio.

Por otro lado, Fox *et al.* (2006) midieron la estabilidad (después de 45 minutos de inmersión) de diferentes fuentes de Met en una dieta deficiente en este AA a base de pasta de soya (67%), obteniendo 0.4 y 2.5% de PMet para las dietas deficiente y suplementada con DL-Met, valores muy por debajo de los encontrados en el presente trabajo.

A partir de una dieta a base de pescado (20%) y gluten de trigo (25%) y AAC (7%), que fue extruida industrialmente, Huai *et al.* (2009b) determinaron el requerimiento de Thr, estudiando la lixiviación de los AA en la dieta (método de Dominy y Lim, 1991). Las pérdidas de Met, Lys y Arg fueron de 6, 11 y 5% a los 30 minutos de inmersión y de 17, 14 y 10% a los 60 minutos de inmersión ($PAA = 1 - \text{contenido en dieta lixiviada} / \text{contenido inicial} * 100$). Las pérdidas calculadas de la misma manera para la dieta deficiente en Met y Lys en el estudio actual, a los 30 y 60 minutos corresponden a 12, 14, 4% y 14, 26, 8% para Met, Lys y Arg, respectivamente. Esta forma de calcular los

valores presenta una tendencia lineal con respecto al tiempo de inmersión, lo cual se contrapone con las cinéticas de PAA presentadas en los resultados del presente experimento, que al parecer llegan a una asíntota desde los 15 minutos. Por otra parte, en el estudio de Huai *et al.* (2009b) la dieta comercial presentó pérdidas de Met, Lys y Arg muy inferiores a los 30 minutos (3.3, 3.4 y 2.4%) y 60 minutos (8.8, 6.7 y 1.04%) con respecto a las observadas en el experimento actual con una dieta del mismo tipo.

Es importante remarcar que a pesar de no haber sido suplementadas con AA libres las dietas control deficiente Met-Lys y comercial presentaron PAA acentuadas en los AAI, especialmente en Met (22 y 27%) y Lys (24 y 31%), lo cual coincide con los resultados reportados previamente por Ricque-Marie *et al.* (2006) para alimentos comerciales no suplementados, donde se reporta una tasa de lixiviación diferencial entre AA y se atribuye la pérdida de estos AA a la proteína soluble de los ingredientes usados en la dieta. Este fenómeno es especialmente importante porque justamente estos AA generalmente son los primeros limitantes.

Las cinéticas de lixiviación observadas coinciden con otros estudios (Cruz-Suarez *et al.*, 2006; Ricque-Marie *et al.*, 2006) en que la mayor pérdida de nutrientes se presenta en los primeros 15 minutos de contacto con el agua, a partir de los cuales la tasa de lixiviación se desacelera. En consecuencia a los 15 minutos de inmersión en el agua, los alimentos experimentales suplementados con AA presentaron un contenido de AA muy similar al alimento control sin suplementación.

7.5.3 Resultados Zootécnicos

Aún cuando los alimentos experimentales a los 15 minutos de inmersión en el agua presentaron contenidos de Met y Lys relativamente semejantes, los camarones que las consumieron a partir de los 35 días mostraron una respuesta significativa a la deficiencia y al exceso de Met y Lys en términos de Suv. A los 42 días al cubrir la deficiencia de Met con 0.4% de Met encapsulada, la adición de Met produjo un incremento del 20% en la Suv y la inclusión de creciente de Lys produjo un decremento

en la Suv de 23% con el máximo nivel de inclusión (1.35%) en las dietas experimentales. Esto concuerda con lo reportado por Millamena *et al.* (1996a) quienes al evaluar el requerimiento de Met en *P. monodon* adicionando niveles crecientes de Met encapsulada en CMC encuentran una mejora en la Suv (de 63 a 83%), obteniendo un 20% de mejora con la adición de 0.16% de Met (0.88% de Met total en la dieta, 2.4% de Met en la proteína), equivalente a la mejora obtenida en este experimento con la adición de 0.4% (0.9% de Met total en la dieta, 2.94% de Met en la proteína). También coincide con la mejora en la Suv reportada por Fox *et al.* (2006) al suplementar diferentes fuentes de Met en *L. vannamei*. Es de subrayar que la adición de Met a la dieta deficiente Met-Lys produjo la mejor Suv en el experimento inclusive mejor que la dieta control comercial que tenía un contenido menor de Met y de AA azufrados, aunque la diferencia no fue significativa.

Al partir del contenido de Lys en el carcas de *L. vannamei* como referencia y considerando un exceso para compensar la pérdida por lixiviación, los niveles de Lys evaluados en este estudio fueron muy superiores (6.45 a 9.85% de la proteína) a los evaluados por Fox *et al.* (1995) (3.43 a 6.57%) y por Millamena *et al.* (1998) (2.95 a 8.2%) en *L. vannamei* y *P. monodon*, respectivamente. En estos estudios solo Millamena *et al.* (1998) reportaron un efecto tóxico ligado al exceso de Lys a partir de 6.1% de Lys, lo cual coincide con la mortalidad encontrada por el exceso de Lys en nuestro estudio, a partir del segundo nivel de inclusión (9.35%) y especialmente con el máximo nivel de inclusión (9.85% de la proteína) que corresponde a un exceso de 40% con respecto al carcas de camarón y 80% respecto a la recomendación de Akiyama *et al.* (1991).

A diferencia de otros estudios (Fox *et al.*, 1995; Millamena *et al.*, 1996a; Millamena *et al.*, 1998; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2007; Fox *et al.*, 2010) la adición de Met y Lys encapsuladas no mejoró el crecimiento y no afectó de manera significativa los demás parámetros zootécnicos posiblemente esto debido al efecto indirecto causado por la mayor densidad generada por la mayor Suv. Solo la UNMet disminuyó significativamente con la adición de Met, y se incrementó gradualmente con la adición de Lys.

Desde otra perspectiva, cuando se consideran únicamente los tratamientos dosis-respuesta con Lys, utilizando la dieta deficiente en Lys como control, se encuentran efectos positivos significativos por la adición de Lys en los parámetros de crecimiento, TCA, UNP y UNMet. Sin embargo, estos resultados deben considerarse como distorsionados en consecuencia del sesgo causado por la mala Suv. Esto se refuerza por la buena correlación que presentan estos parámetros con el % de Suv.

La respuesta observada en sobrevivencia significa que los camarones respondieron a la presencia en la dieta de los AA encapsulados suplementados en los primeros minutos de alimentación por el rápido consumo del alimento, como lo mencionan en su trabajo Palma *et al.* (2006) con *Palaemonetes varians* al determinar el requerimiento de Lys, Met y Arg y Nunes *et al.* (2010) quienes también han reportado respuestas a la suplementación de AA libres en dietas con alta tasa de lixiviación; la otra alternativa es que los camarones sean capaces de utilizar los AA disueltos en el agua.

Fox *et al.* (2006) señalan que los requerimientos del camarón podrían estar cubiertos a niveles de 0.4% de Met en dietas a base de soya. Como en este estudio estamos encontrando una respuesta con la adición de Met a la dieta de base conteniendo 0.5% de Met, es evidente que el punto de quiebre es superior a 0.4%. Por otro lado el incremento en la Suv se encuentra asociado a una disminución significativa de UNMet, lo anterior podría deberse a que el organismo evita la pérdida del nutriente cuando hay una señal de deficiencia en Met.

Acorde a lo anterior Swick *et al.* (1995) reportó un incremento en el crecimiento de *P. monodon* con una dieta a base de pasta soya (20%) y harina de pescado (10%) suplementada con 0.5% de DL-Met.

En contraste con Biswas *et al.* (2007) quienes consideran que el primer AA limitante es la Lys y no la Met al sustituir harina de pescado por pasta de soya como principal ingrediente, en función del contenido de Lys en el carcas de camarón, la dieta control a base de soya (hipotéticamente deficiente en Met-Lys) en este trabajo presentó como primer limitante a la Met ya que la adición de Met mejoró significativamente la

Suv, mientras que la adición creciente de Lys lejos de mejorar el rendimiento causo mortalidad por exceso.

7.6 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta

(Experimento 6)

Con base en los resultados obtenidos en un bioensayo previo, realizado para evaluar productos de Met para la compañía Degussa y debido a la dificultad para obtener lupino y chícharo amarillo, se propuso un cambio en la formulación de la dieta deficiente en Met, incluyendo chícharo verde, aislado de soya y gluten de trigo en proporciones que permitieran mantener una deficiencia importante de Met pero cubriendo los requerimientos de Lys respecto al contenido en el carcas de camarón. De acuerdo a lo esperado, la exclusión de lupino, la inclusión de gluten de trigo, aislado de soya y el incremento de chícharo mejoró la estabilidad de los alimentos con respecto al alimento preparado para Degussa. La PMS de la dieta deficiente en Met chícharo amarillo² se vio reducida probablemente debido a la exclusión lupino que tiene un mayor contenido de fibra cruda (15%) en comparación del chícharo (5.5%) o la pasta de soya (4%) (Ewing, 1998; Hertrampf and Piedad-Pascual, 2003; Hickling, 2003).

Por otro lado la aplicación del método modificado para evaluar la estabilidad en el agua arrojo valores de PMS para el alimento de Degussa mayores a los reportadas en 2006 (Cruz-Suarez *et al.*, 2006), debido a los cambios en el método de lixiviación y en los cálculos al aplicar la corrección por sal depositada. Las ABS y PMS encontradas en el presente experimento son consistentes con las encontradas en el experimento anterior (evaluando la adición de Met y Lys encapsulada), donde se evaluó la modificación del método de lixiviación sin la presencia de grandes diferencias numéricas.

El cambio de chícharo amarillo a verde no causo diferencia en la estabilidad en el agua y la capacidad de absorción como era de esperarse considerando la similitud química reportada entre las variedades amarilla y verde (Hickling, 2003).

7.7 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya

evaluado en acuarios (Experimento 7)

7.7.1 Análisis químico de las dietas

Las dietas experimentales fueron isoproteicas (34%), aunque dos puntos por encima del valor esperado. Sin embargo, los contenidos analizados de Met y Lys en la dieta de base concordaron con lo esperado. Con lo anterior el alimento de base presentó un menor contenido de Met (40%) y de Lys (10%) con respecto al 34% de proteína de carcas de camarón, pero exclusivamente menor en Met (36%) para el 32% formulado. Por otra parte el contenido de Met fue menor en 48% considerando las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) para 34% de proteína y con un exceso de Lys (13%). La inclusión de chícharo permitió exitosamente conseguir niveles muy bajos en Met y evitar la deficiencia en Lys señalada por Biswas *et al.* (2007) en dietas formuladas a base de soya. Esto indicaría que la Met debería ser el primer limitante en la fórmula deficiente chícharo verde 2 y que la suplementación de este AA manifestaría una respuesta positiva sobre el camarón.

Por otro parte, el alimento comercial cumple con los requerimientos considerando los requerimiento de Met y Lys reportados para *P. monodon* por Millamena *et al.* (1996a; 1998) (2.4 y 5.2% de la proteína) y de Lys reportado para *L. vannamei* por Fox *et al.* (1995) (5.19% de la proteína), que son muy parecidos a los recomendados por Akiyama (1991). Por otra parte la dieta comercial presentó un exceso de 14% en el contenido de Met y apenas cubrió el contenido de Lys con respecto al carcas de camarón.

De acuerdo con los resultados de los análisis de AA de los alimentos y con el diseño experimental, la adición de Met permitió cubrir o exceder la deficiencia en Met presentada en la dieta de base (control) en diferentes proporciones según la referencia de requerimiento utilizada. En consecuencia tenemos que al suplementar las dietas con 0.4%

de DL-Met (0.81% de Met total en la dieta, 2.32% de proteína) se cubrió y excedió el contenido de Met presente en carcas de camarón en 12% y la recomendación de Akiyama *et al.* (1991) únicamente se cubrió.

7.7.2 Análisis físico de las dietas

Una menor ABS de agua en los alimentos comerciales se ha asociado con un mayor grado de cocción en los almidones, además de una mejor compactación de las dietas y esto a su vez genera un menor grado de PMS (Cruz-Suarez *et al.*, 2006). Los efectos de los procesos, así como de los dispositivos sobre la ABS y estabilidad de los alimentos ya han sido descritos por distintos autores (Devresse, 1998; Muñoz, 2004; Bortone, 2006). Por otro lado el uso de ingredientes con alto contenido de almidones (trigo y chícharo) e hidrocoloides (algas) en alimentos experimentales para camarón han reportado absorciones por encima del 100% a los 60 minutos de inmersión (Cruz-Suárez *et al.*, 2002; Cruz-Suárez *et al.*, 2006; Ricque-Marie *et al.*, 2006). En el presente experimento los valores de ABS en las dietas experimentales son inferiores a los obtenidos en los experimentos previos del presente trabajo, aunque la ABS de la dieta deficiente en Met chícharo verde 2 presenta un valor semejante al encontrado en el experimento 6 con la dieta deficiente chícharo verde 1.

La PMS más importante de los alimentos se dio a los 15 minutos de inmersión, que corresponde con lo reportado para los alimentos del experimento 5, sin embargo en el presente experimento las PMS presentaron un pendiente más marcada con respecto al tiempo de inmersión. Después de 60 minutos de inmersión en el agua los alimentos presentaron una PMS de alrededor del 14% aceptable, aunque un poco mayor a lo reportado para alimentos utilizados en estudios relacionados (Dominy and Lim, 1991; Fox *et al.*, 1995; Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Cruz-Suárez *et al.*, 2002).

La mayor PPC de los alimentos se dio en los primeros 15 minutos de inmersión en agua como en la PMS, sin embargo la PPC de la dieta comercial fue de la misma magnitud que las dietas experimentales. Adicionalmente la PPC se estabilizó a diferencia

de la continua PMS, esto podría deberse a que la mayor parte de la proteína soluble en los alimentos se lixivia dentro de esos primeros 15 minutos de inmersión y representan un amplio porcentaje de la PMS; la PPC deja espacios que son ocupados por agua y reduce las fuerzas moleculares del pellet, lo que favorece a que otros nutrientes menos solubles tengan una pérdida paulatina y ello incrementa la PMS en forma continua. Los alimentos mostraron una PPC de 16% a los 60 minutos de inmersión que fue mayor a lo reportado en el experimento 1 con dietas experimentales procesadas industrialmente y en el experimento 5 con dietas semejantes. Por otro lado los alimentos presentaron PPC semejantes a los estudios reportados por Lim (1993) Cruz-Suarez *et al.* (2001) pero mayores a lo encontrado por Cruz-Suarez *et al.* (2002).

Las pérdidas de Met, Lys y Arg (de 17 a 19%) en el presente experimento para la dieta deficiente en Met chícharo verde 2 (donde la PAA corresponde a la proteína integra) fueron menores a las observadas con la dieta de base, de fabricación industrial, en el experimento 1 (PMet y PLys de 40% y PArg de 30%); fueron semejantes a la PMet (23%) y la PArg (20%) de la dieta de base en el experimento 2, no así la PLys (55%); correspondieron con los valores obtenidos en el experimento 5 (22-26% de PMet, 22-28% de PLys y 17-16% de PArg) para la dieta deficiente en Met-Lys. Otros estudios del Laboratorio de Maricultura han reportado PAA del mismo orden, donde la PMet y PLys (25%) es ligeramente mayor que la pérdida de Arg (20%) (Cruz-Suárez *et al.*, 2006; Ricque-Marie *et al.*, 2006).

Lim (1993) observó que las PAA en las dietas experimentales adicionadas con 16% de AAL (para obtener un 28% de proteína dietaria) se acentúan en los AAI, especialmente en Met (53%) y Lys (30%) los cuales fueron incluidos en 0.55 y 1.76% de la dieta; la PMet concuerda con lo encontrado en la dieta suplementada con 0.4% de DL-Met en el presente experimento donde se observó una pérdida completa de la Met suplementada. En el mismo sentido Fogle *et al.* (1999) encontraron una PMet de 40% a los 15 minutos en una dieta para camarón a base de pasta de soya, trigo y pescado adicionada con DL-Met. Huai *et al.* (2009b) en una dieta extruida industrialmente, a base de pescado (20%) y gluten de trigo (25%) y AAC (7%), obtuvieron pérdidas de Met, Lys y Arg de 17, 14 y 10% a los 60 minutos de inmersión. En contraste Alam *et al.* (2005)

presentaron pérdidas de Met y Lys de 1% (15 minutos) para una dieta a base de aislado de soya y calmar suplementada con AAC sin encapsular; además Fox *et al.* (2006) midieron la pérdida (después de 45 minutos de inmersión) de diferentes fuentes de Met en una dieta deficiente en este AA a base de pasta de soya (67%), obteniendo 0.4 y 2.5% de PMet para las dietas deficiente y suplementada con DL-Met. Probablemente las diferencias con estos últimos dos estudios sea debido a los efectos de las distintas metodologías, el material de análisis (alimento o agua) y los cálculos empleados, como se discutió en el experimento 5.

7.7.3 Resultados Zootécnicos

A los 15 minutos de inmersión en el agua el contenido de AA en los alimentos y en particular el de Met fueron relativamente semejantes entre las dietas experimentales. La escasa sobrevivencia en el presente experimento, en especial en las dietas más deficientes en Met obligo a terminarlo a los 15 días. En contraste con la suplementación de 0.4% de DL-Met encapsulada en Agar para exceder en 42% el contenido de Met de carcas de camarón en el experimento 5, la suplementación de 0.4% de DL-Met libre a la dieta deficiente chícharo verde 2 para exceder en 14% dicho requerimiento no mejoró significativamente la Suv de los camarones que consumieron este tratamiento, a pesar de que en ambos casos la Met suplementada se perdió casi en su totalidad a los 15 minutos de inmersión. En el mismo sentido Millamena *et al.* (1996a) encuentran una mejora numérica en la Suv (de 63 a 83%) hasta encontrar el requerimiento de Met (0.88% de Met total en la dieta, 2.4% de Met en la proteína) en *P. monodon* adicionando niveles crecientes de Met encapsulada en CMC, coincidiendo con el valor recomendado de Akiyama *et al.* (1991) y expresando un exceso de 15% con respecto al carcas de *L. vannamei*. También contrasta con la mejora numérica en la Suv reportada por Fox *et al.* (2006) al suplementar diferentes fuentes de Met en *L. vannamei*.

Por otra parte, Forster y Dominy (2006) tampoco observaron un incremento en la Suv o en el crecimiento al suplementar con 0.5% de DL-Met una dieta a base de proteína

vegetales (48.6% de trigo entero, 29.3% de pasta de soya y gluten de trigo 4%) adicionada con AA cristalinos (0.5% de Arg, 0.5% de Lys-HCl, 0.2% de Thr y 1% Glu) con una deficiencia de 30% con respecto al carcas de camarón. De manera semejante Palma *et al.* (2006) en la determinación del requerimiento de *Palaemonetes varians* (0.9% de la dieta, 2% de la proteína) a base de una dieta de pescado (14%), gluten de trigo (10%), gelatina (2.5%) y una mezcla de AA (16-19%) con un contenido de 0.5% de Met (1.1% Cys) y suplementado Met libre no obtuvo diferencias en la supervivencia pero se hicieron presentes cubriendo el 96% del contenido de Met en carcas de *L vannamei*.

A pesar de una deficiencia del 40% de Met con respecto al carcas de camarón crecimiento no se mejoró significativamente (TCE 3.26-3.77) con la suplementación de DL-Met libre en el presente experimento, sin embargo fue parecido a los crecimientos del experimento 5 con las dietas experimentales (TCE 3.12-3.69); las dietas suplementadas con 0.2 y 0.4% de DL-Met comienzan a mostrar crecimientos similares a los reportados en los experimento 1 y 2 (TCE de 3.9 y 3.8, a 28 días). Por el contrario Swick *et al.* (1995) reportó un incremento en el crecimiento de *P. monodon* con una dieta a base de pasta soya (20%) y harina de pescado (10%) cuando son suplementadas con 0.5% de DL-Met. En acorde a lo anterior Millamena *et al.* (1996a) obtuvo diferencias significativas en el crecimiento.

En una serie de bioensayos de crecimiento en tanques con producción natural Fox *et al.* (2006) evaluaron la eficiencia de DL-Met, HMTBA unido a Mn, Ca, Cu y Zn y Polymet como fuentes de Met sobre dos dietas deficientes en Met (35 y 40% del carcas, respectivamente) similares a la deficiencia en Met (40%) alcanzada en el presente experimento con la dieta deficiente Met chícharo verde². La primer dieta fue formulada a base de pasta de soya (53.2%) y subproductos de ave (6%) y la segunda a base de pasta de soya (44.60%), subproductos de pollo (6%) y gelatina (5%). La primer dieta fue suplementada con 0.10% de DL-Met para quedar en una deficiencia de solo 21% de Met y la segunda con 0.05 y 0.1% para reducir la deficiencia de Met a niveles de 32 y 24%; aunque no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento (GP mayores a 1500 y 740% respectivamente) lo que concuerda con los resultados de crecimiento en el presente experimento al suplementar DL-Met. Aunque Fox *et al.* (2006) señalaron que

los requerimientos del camarón podrían estar cubiertos a niveles de 0.4% de Met en dietas a base de Soya, la baja Suv en el presente experimento, así como los pobres crecimientos indican que podrían ser necesarios mayores contenidos de Met para salvaguardar la producción de biomasa.

7.8 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya

evaluado en jaulas (Experimento 8)

A pesar de que la dieta suplementada con 0.8% de DL-Met libre se fabricó en una sesión posterior al resto de las dietas experimentales que habían sido tomadas del experimento 7, este nuevo tratamiento presentó un contenido proteico relativamente similar (34%), aunque dos puntos por encima del valor esperado. Sin embargo, los contenidos analizados de Met y Lys en el conjunto de dietas concordaron con lo esperado. Con lo anterior el alimento control presentó un menor contenido de Met (40%) y de Lys (10%) con respecto al 34% de proteína de carcas de camarón, pero menor en Met (36%) para el 32% fórmulado. Por otra parte el contenido de Met fue menor en 48% considerando las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) para 34% de proteína y con un exceso de Lys (13%).

Al suplementar las dietas con 0.8% de DL-Met (1.16% de Met total en la dieta, 3.36% de la proteína) se cubrió y excedió en 62% el contenido de Met en carcas de camarón y la recomendación de Akiyama *et al.* (1991) en 40%. Esto significa que si la Met debería es el primer limitante en la fórmula deficiente chícharo verde 2, el consumo de esta dieta debería producir una mejor sobrevivencia y crecimiento en el camarón.

Por otra parte, el alimento comercial cumplió con los requerimientos considerando los requerimiento de Met y Lys reportados para *P. monodon* por Millamena *et al.* (1996a; 1998) (2.4 y 5.2% de la proteína) y de Lys reportado para *L. vannamei* por Fox *et al.* (1995) (5.19% de la proteína), que son muy parecidos a los recomendados por

Akiyama. Así mismo la dieta comercial presentó un exceso de 14% en el contenido de Met y apenas cubrió el contenido de Lys con respecto al carcas de camarón.

7.8.1 Análisis físico de las dietas

Los análisis de físicos de todos los alimentos desarrollados a partir de la dieta deficiente chícharo verde 2 (de los experimento 7 y 8) se realizaron en conjunto, a pesar de que el alimento suplementado con 0.8% de DL-Met se elaboró en una sesión diferente del resto.

Los valores de ABS obtenidos para la dieta comercial fueron inferiores a los obtenidos con las dietas experimentales, como se discutió en la sección anterior esto se debe principalmente a que los dispositivos industriales presentan un mayor grado de cocción de los almidones y una mejor compactación de los alimentos, lo que forma una cubierta menos permeable al agua y por ello disminuye la ABS de agua con respecto a los procesos de fabricación en laboratorio (Cruz-Suárez *et al.*, 2006).

La ABS, la PMS y la PPC ya fueron discutidos en el experimento anterior para las dietas empleadas en el experimento 7. La suplementación de 0.8% de DL-Met libre confirma una tendencia a que un incremento en el contenido de ingredientes almidonosos permita una mayor ABS con respecto al tiempo de inmersión de los alimentos en el agua cuando estos no están totalmente gelatinizados. La dieta suplementada con 0.8% de DL-Met presentó valores ligeramente menores de ABS a los 15 minutos, lo cual implicó una menor PMS y PPC en ese periodo en particular, tal vez debido a que el alimento presentó una mejor gelatinización de los almidones y el tiempo necesario para permear el pellet fue de 60 minutos para llegar a valores semejantes de PMS y PPC al resto de las dietas evaluadas.

Las Pérdidas de Lys y Arg (32 y 23%) se incrementaron en la dieta suplementada con 0.8% de DL-Met con respecto a los valores obtenidos para el resto de las dietas (19 y 17%) en el presente experimento (donde la PAA corresponde a la proteína íntegra).

Aunque las pérdidas de Lys y Arg se incrementaron en la dieta suplementada con 0.8% de DL-Met, fueron menores a las observadas en el experimento 1 (de 40 y 30%, respectivamente) con dietas experimentales de fabricación industrial; la PLys fue menor y la PArg fue semejante a los valores en el experimento 2 (55% y 20%, respectivamente); fueron semejantes a los valores obtenidos en el experimento 5 (de 22 a 28% de PLys y de 17 a 16% de PArg). Contrario a lo descrito por Fox *et al.* (2006) y Alam *et al.* (2005), la PMet en forma de aminoácido cristalino es completa, por consiguiente la PMet total se incrementa con forme es suplementada en mayores cantidades; esto es apoyado con los resultados obtenidos por Lim (1993) y Fogle *et al.* (1999); donde las PMet fueron de 53 y 40% en dietas suplementadas con 0.55% y 0.50% de DL-Met respectivamente.

7.8.2 Resultados Zootécnicos

La utilización de jaulas individuales no había sido reportada en estudios de crecimiento empleando dietas suplementadas con AA, tal vez debido a que se considera a *L. vannamei* como una especie gregaria. En el presente experimento se logró evitar exitosamente el canibalismo observado en el experimento anterior con el grueso de las dietas experimentales. No obstante, la Suv de los camarones en el presente experimento no fue del 100% y continuó siendo baja para ensayos de crecimiento; incluso con la dieta control comercial (60%), con la que se cubrió el perfil de AA recomendado por Akiyama *et al.* (1991). Esto significa que el factor jaula y cultivo individual afecta negativamente el crecimiento y la sobrevivencia, aun más que la deficiencia de Met.

A los 15 minutos de inmersión en el agua los contenidos de AA, en particular el de Met, en los alimentos fueron relativamente semejantes. A pesar de tener un exceso de 62% de Met con respecto a los valores en carcas de *L. vannamei*, la Suv de los camarones alimentados con la dieta suplementada con 0.8% de DL-Met no mejoró (contrario a lo esperado, según el antecedente del experimento 5) con respecto a la dieta deficiente; De hecho, la Suv de los camarones alimentados con las dietas experimentales incluso fue inferior a los valores reportados para el experimento previo desde los 7 días de

bioensayo, lo que hace pensar en la existencia de un efecto jaula negativo sobre el rendimiento del camarón. Sin embargo hay que considerar que el número de camarones iniciales por tanque no fue el mismo (10 animales libres vs. 5 animales enjaulados) y esta diferencia en el contenido inicial de camarones tiene un impacto más marcado en el experimento actual.

Por otro lado Millamena *et al.* (1996a) encuentran una mejora numérica en la Suv (de 63 a 83%) hasta encontrar el requerimiento de Met (0.88% de Met total en la dieta, 2.4% de Met en la proteína) en *P. monodon* adicionando niveles crecientes de Met encapsulada en CMC, coincidiendo en su requerimiento con el valor recomendado de Akiyama *et al.* (1991) y expresando un exceso de 15% con respecto al carcas de *L. vannamei*. En el mismo sentido Fox *et al.* (2006) reportaron una mejora en la Suv al suplementar diferentes fuentes de Met en *L. vannamei*, contrastando con lo encontrado en el presente experimento.

En cambio Forster y Dominy (2006) no observaron una mejor Suv al suplementar con 0.5% de DL-Met una dieta 30% deficiente con respecto al carcas *L. vannamei* a base de proteínas vegetales (48.6% de trigo entero, 29.3% de pasta de soya y gluten de trigo 4%) y adicionada con AA cristalinos (0.5% de Arg, 0.5% de Lys-HCl, 0.2% de Thr y 1% Glu). Palma *et al.* (2006) en la determinación del requerimiento de *Palaemonetes varians* (0.9% de la dieta, 2% de la proteína) y llegando a cubrir hasta el 96% del carcas de *L. vannamei*, tampoco obtuvo diferencias en la supervivencia.

El crecimiento de los camarones en jaulas con las dietas experimentales fue muy bajo (TCE de 1.04-1.26) comparado a los crecimientos presentados en los experimentos previos (TCE >3.00). Las diferencias significativas encontradas (EA, y TEP) corresponden a un mayor peso final de los camarones alimentados con la dieta control comercial, que en todo caso no fue adecuado (Vazquez-Añón and Giesen, 2004). Aunque Fox *et al.* (2006) señalaron que los requerimientos del *L. vannamei* podrían estar cubiertos a niveles de 0.4% de Met en dietas a base de Soya los pobres crecimientos en el presente experimento, así como la baja Suv indicaron que podrían ser necesarios mayores contenidos de Met para salvaguardar la producción de biomasa.

Por otra parte estudios semejantes donde dietas con un bajo contenido de Met son suplementadas en exceso con diferentes fuentes de Met, han reportado una respuesta positiva en el crecimiento (Swick *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 2006). Así mismo el crecimiento ha sido el parámetro empleado en la determinación del requerimiento de Met para *P. monodon* (Millamena *et al.*, 1996a) y *P. varians* (Palma *et al.*, 2006).

Considerar al individuo como la unidad experimental, lejos de encontrar diferencias significativas, expresó una variabilidad mayor para cada uno de los tratamientos, lo que se tradujo en un coeficiente de significancia mayor. La presencia de mortalidad y los bajos crecimientos, nos hace cuestionarnos la larva o las condiciones del agua de cultivo utilizadas. Sin embargo, las condiciones fisicoquímicas del agua del cultivo fueron adecuadas para *L. vannamei*, lo que sugiere la presencia de algún factor biológico que impactó en el crecimiento.

7.9 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad

(Experimento 9)

7.9.1 Análisis químico de las dietas

Las dietas experimentales fueron isoproteicas (35%) aunque a un nivel ligeramente más elevado lo esperado. Adicionalmente presentaron un contenido proximal muy semejante al de las dietas basadas en la fórmula deficiente chícharo verde 2. En consecuencia se podría suponer que el perfil de AA también sería semejante al analizado en las dietas anteriores.

7.9.2 Análisis físico de las dietas

Los factores que pueden afectar la estabilidad del alimento son: las propiedades ingredientes empleados en el alimento, el tipo de aglutinantes empleados, así como el tipo de procesamiento (Cruz-Suarez et al., 2006). El proceso mayoritariamente distribuido en la industria de los alimentos para camarón es el peletizado (80%), sin embargo la cocción termoplástica (extrusión a presiones y temperatura elevadas) ha tomado relevancia en los alimentos para acuicultura (Bortone, 2002). Las problemáticas asociadas a la estabilidad de los alimentos en el peletizado se asocian a la reducida cantidad de agua empleada en la mezcla (6-7%) en relación a la cantidad de almidones presentes en las dietas comerciales (Devresse, 1998) como para poder llevar a cabo la completa gelatinización de estos; en el chícharo se estima un contenido de 40-60% de almidón (Donangelo *et al.*, 1986; Thiessen *et al.*, 2003; Yemane and Skjelvåg, 2003; Yadav *et al.*, 2010) mientras que el trigo tiene alrededor de 36% de almidón (Davis and Arnold, 1993). El almidón de las harinas no solo representa una fuente de energía, también constituye un aglutinante de importancia en alimentos peletizados una vez que es gelatinizado (Bortone, 2002).

El proceso de peletizado en un molino cárnico como el desarrollado en los presentes alimentos experimentales posee características mixtas de los dos procesos industriales (peletizado y extruido). Por un lado las presiones y temperaturas alcanzadas dentro del alimentador son relativamente bajas (menores a 90 C) y por lo tanto el pelet presenta pocas celdas producidas por la evaporación de agua en el secado, es denso y no flota, además de que los almidones se gelatinizan parcialmente por efecto del corte mecánico como ocurre en el peletizado industrial (Devresse, 1998). Por otra parte la humedad en la mezcla de los ingredientes es elevada (30%), la cual es transportada por un tornillo sin fin el cual imprime una fuerza de corte de igual forma que en el proceso de extrusión con temperaturas a la salida del dado de entre 60-90C, en función de las propiedades de la matriz (Bortone, 2002, 2006) el cual supone una mayor gelatinización de los almidones.

Al implementar el proceso de pos-acondicionamiento (125C y 18Psi) en el presente experimento se emularon las etapas en las que se imprimen las fuerzas de corte por los segmentos del tornillo sin fin, donde la temperatura y presión se incrementan, dando el efecto termoplástico a la matriz. Según Bortone (2006) el proceso de pos-acondicionamiento en alimentos peletizados y extruidos mejora en un 20% la gelatinización de los almidones. Por otro lado en alimentos para acuicultura se ha reportado que un proceso termoplástico incrementa la gelatinización de los almidones (Davis and Arnold, 1993; Cousin *et al.*, 1996; Drew *et al.*, 2007). El pos-acondicionamiento permite una lenta liberación del vapor contenido en el pelet y con ello permite el acercamiento de moléculas de almidón o de almidón y otras macromoléculas, permitiendo la compactación del pelet y una mayor estabilidad del mismo (Bortone, 2002). La disminución en la ABS con el proceso de pos-acondicionamiento se atribuyó a la formación de una matriz compacta con alto grado de gelatinización en los almidones y por consiguiente poco permeable. También se asocia con un mayor contenido de humedad en el pelet pos-acondicionado, debido a que el vapor de agua en el núcleo del pelet no pudo atravesar la matriz más compacta de las capas externas del pelet, a diferencia del alimento sin pos-acondicionamiento.

Los almidones gelatinizados sirven como aglutinante en los alimentos para camarón (Devresse, 1998; Bortone, 2006), lo que concuerda con la disminución de un 40% de PMS con el proceso de pos-acondicionamiento en las dietas del presente experimento. Cruz-Suarez *et al.* (2001) reportaron una disminución en la PMS, cuando la harina chícharo entero fue extruida antes de incluirla en el alimento e indicaron una mayor gelatinización de los almidones. Bortone (2006) ha descrito que con las tecnologías de acondicionamiento se puede llegar a gelatinizar hasta un 50% de los almidones en el alimento. Por otra parte, valores elevados de la gelatinización de los almidones del pelet conduce a una reducción en la estabilidad del pelet, debido a la dextrinización de los almidones, donde la amilosa se lixivia y se pierde la capacidad aglutinante del almidón (Devresse, 1998; Bortone, 2002; Rao, 2007). En el presente experimento la ABS y la PMS se incrementaron significativamente con el tiempo de inmersión, independientemente del proceso que hayan sufrido las dietas; esto corresponde con los resultados obtenidos en los experimentos 5,7 y 8.

7.9.3 Resultados de Digestibilidad

El proceso de pos-acondicionamiento no afectó la DAMS (78%) y DAED (85%) en la dieta deficiente en Met chícharo verde¹, sin embargo la DAP se redujo significativamente de 92-90% con dicho proceso. Davis *et al.* (2002) con una dieta a base de pescado (30%), pasta de soya (25%), Nutribinder (10%) y almidón de trigo como relleno, evaluó la digestibilidad de la harina de chícharo procesada de diferentes maneras (extruido, micronizado, descascarillado y descascarillado y extruido) en *L. vannamei*, obteniendo valores de la DAP de 77% y de la DAED de 72.6% en la dieta con la harina de chícharo entero sin procesar y en la dieta con la harina de chícharo extruida de 82 y 77% respectivamente; la harina de chícharo sin procesar presentó 90% de DAP y 72% de DAED, mientras con la extrusión fueron de 111 y 86% respectivamente. La DAP y DAED de la dieta actualmente evaluada fue muy superior a la digestibilidad de las dietas evaluadas por Davis *et al.* (2002); la DAP en las dietas actualmente evaluadas fue parecida a la digestibilidad reportada para la harina de chícharo sin procesar, mientras que la DAED fue similar a la encontrada en la harina de chícharo extruida.

Por otra parte Cruz-Suarez *et al.* (2001) emplearon una dieta a base de pescado (23%), harina de trigo (23%), pasta de soya (7%), harina de camarón (4%) y adicionadas con DL-Met (0.14%), para cubrir las recomendaciones de Akiyama *et al.*, (1991) para evaluar la digestibilidad en *L. stylirostris* de la harina chícharo procesada de la misma forma que indicó Davis *et al.* (2002). Para la dieta con harina de chícharo sin procesar los valores fueron de 79% de DAMS y 90% DAP, los cuales no fueron afectados por el proceso de extrusión; los valores de DAMS y DAP para la harina de chícharo sin procesar fueron de 89 y 80% los cuales tampoco fueron afectados por la extrusión; la corrección de los valores de digestibilidad por lixiviación de los componentes de la dieta redujeron las DAMS y DAP a niveles de 77 y 88% para las dietas, aunque en los ingredientes se presentó un incremento no significativo en DMS (87-90%) y DAP (77-87%) con la extrusión. Los valores de DAMS y DAP de las dietas evaluadas en el presente experimento son muy semejantes a los encontrados por Cruz-Suarez *et al.* (2001) con y sin corregir por lixiviación; los resultados de la DAP son

semejantes a lo reportado por Cruz-Suarez *et al.* (2001) para la harina de chícharo extruida sin corregir por lixiviación y en acorde la relación establecida con los resultados de Davis *et al.* (2002).

Existe una mayor gelatinización de los almidones cuando los ingredientes se ha extruido previamente (Davis and Arnold, 1993; Drew *et al.*, 2007), una extrusión en húmedo gelatiniza una mayor cantidad de almidón que una extrusión en seco (Davis and Arnold, 1995), sin embargo Davis (1995) indicó que la gelatinización de los almidones no necesariamente incrementa la digestibilidad de la energía en camarón, aunque Cousin *et al.* (1996) encuentra una mayor digestibilidad de los almidones en ingredientes donde los almidones fueron previamente gelatinizados. Esto se explica debido a que una elevada gelatinización de los almidones desgarran el granulo de almidón y permite la salida de amilosa del granulo, así como la activación de amilasas y la liberación de azúcares simples (Rao, 2007); una vez inmerso el alimento en agua tanto la amilosa, como los azúcares libres son fácilmente lixiviables, y el valor de la energía consumida es sobreestimado, de manera que incluso la digestibilidad de la energía puede verse disminuida; sin embargo el almidón consumido en realidad es mejor aprovechado.

En el presente experimento se considera que en el alimento hay una gelatinización parcial de los almidones, suficiente para mejorar la estabilidad estructural del pelet mediante interacciones entre las moléculas de almidón y almidón, proteína o grasas como lo indica Devresse (1998), pero no en exceso para disminuir la DAE; aunque la probable interacción de las moléculas de proteína con los azúcares del almidón pudo disminuir ligeramente aunque de forma significativa la DAP. Es prudente hacer un análisis del costo beneficio de disminuir la PMS en función de una ligera reducción de la DAP. En el presente trabajo se justifica disminuir ligeramente la DAP si esto lleva a una disminución considerable de la PMS en la dieta, que es uno de los requisitos para la evaluación eficaz del requerimiento de AA cuando se emplean AAC, altamente solubles.

La presencia de diferentes factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, ácido fítico, taninos, lectinas, alcaloides, saponinas, oligosacáridos y glucósidos en el chícharo disminuyen la digestibilidad de los carbohidratos y proteínas (Donangelo *et al.*, 1986; Bishnoi and Khetarpaul, 1994; Cruz-Suarez *et al.*, 2001;

Bautista-Teruel *et al.*, 2003; Hickling, 2003; Drew *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2008; Davies and Gouveia, 2010). Sin embargo el efecto de ellos sobre la digestibilidad de los alimentos para camarón es reducido debido a las siguientes razones: El proceso de peletizado inactiva a los inhibidores de proteasas debido a que son termolábiles (Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Muñoz, 2004; Bortone, 2006), Thiessen *et al.* (2003) sugieren además la inactivación de la lipogenasa (afecta palatabilidad), el fitato y los glucosinolatos. La incorporación de agua en la mezcla permite la activación de ciertas enzimas hidrolíticas que actúan sobre los factores antinutricionales con una función de reserva de nutrientes en los organismos vegetales (Bishnoi and Khetarpaul, 1994). En presencia de humedad la fitasa se activa, calor predispone a la liberación de el primer fosfato del fitato y hace más sensible el anillo del ácido fítico en comunicación personal con Guerrero (2009). La selección ha llevado a una reducción de taninos y lectinas (Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Bautista-Teruel *et al.*, 2003). En concordancia con las premisas anteriores, la sustitución de 8-42% de una mezcla de pasta de soya (25%), harina de trigo (17%), y salvado de arroz (9%) por chícharo forrajero en una dieta para *P. monodon* reportó una mejora en la DAMS (71-77%) y DAP (84-87%) con la inclusión de mayores cantidades de chícharo (Bautista-Teruel *et al.*, 2003); los valores de DAMS y DAP con 42% de Chícharo son muy semejantes a los encontrados en el presente experimento con la dieta deficiente en Met chícharo verde1.

7.10 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre

la estabilidad de la dieta y rendimiento de *L. vannamei* (Experimento 10)

7.10.1 Análisis químico de las dietas

Los contenidos de 33% de proteína y 4.7Kcal encontrados en las dietas del presente experimento son similares a lo esperado en la fórmula deficiente en Met chícharo verde1. Sin embargo, los contenidos analizados de Met y Lys en la dieta de base concordaron con lo esperado. Con lo anterior el alimento de base presentó un menor

contenido de Met (44%) y de Lys (14%) con respecto al 33% de proteína de carcas de camarón. Por otra parte el contenido de Met fue menor en 52% considerando las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) para 34% de proteína y con un exceso de Lys (7.4%). Las dietas suplementadas con 0.4% de DL-Met encapsulada en CMC (0.71% de Met total en la dieta 2.15% de proteína) presentaron un exceso de 4% de Met con respecto al contenido en el carcas de camarón.

Por otra parte la dieta comercial cumple con los requerimiento de Lys para *L. vannamei* (Fox *et al.*, 1995) y *P. monodon* (Millamena *et al.*, 1998), pero presentó una deficiencia en Met (10%) de la misma magnitud que aquellas dietas suplementadas con la Met encapsulada en CMC respecto a las recomendaciones para la industria (Akiyama *et al.*, 1991) o el requerimiento reportado para *P. monodon* (Millamena *et al.*, 1996a)

7.10.2 Análisis físico de las dietas

La ABS presentada para el experimento actual no presento una reducción significativa con el pos-acondicionamiento de la dieta, a diferencia de la reducción (de 131 a 77%) ocurrida con los alimentos elaborados para el experimento de digestibilidad, previo a este. Aunque los valores de ABS son mas semejantes con los valores de la dieta pos-acondicionada de aquel experimento. Probablemente la causa de que las ABS hayan sido muy parecidas es que hubiera mayor gelatinización de los almidones en el proceso del peletizado.

La dieta deficiente en Met chícharo verde 1 presentó una PMS semejante a la obtenida en los experimentos 6 y 9 con la misma dieta y a las PMS obtenidas en los experimentos 7 y 8 con la dieta deficiente en Met chícharo verde2. Los alimentos a base de la dieta deficiente en Met chícharo verde 1 en el experimento actual presentaron una reducción de 30% de PMS con el pos-acondicionamiento, a diferencia del 40% logrado en el experimento9 (de digestibilidad) con la misma dieta. La PMS en las dietas pos-acondicionadas del presente experimento se ubican dentro de los valores (6.6-11.9%) reportados por Dominy y Lim (1991) en alimentos peletizados industrialmente para *L.*

vannamei con 32% de soya utilizando diferentes aglutinantes comerciales (inclusión máxima de 5%) y por Lim (1993) para un dieta comercial. Fox *et al.* (1995) también presentan valores semejantes de PMS, aunque en el doble de tiempo (a base 35% de gluten de trigo, 3% de solubles de pescado y 4.1% de AAC, PMS de 8.2%) con las dietas donde determina que la Lys es el primer AA limitante para *L. vannamei*.

Bautista-Teruel *et al.* (2003) presentaron valores semejantes de PMS a los obtenidos en el presente experimento con una dieta a base de pasta de soya (25%), harina de trigo (17%), y salvado de arroz (9%), donde estos ingredientes son reemplazados en 8-42% de chícharo en la dieta, pero con 4 horas de inmersión. Por otra parte Cruz-Suarez indicó una PMS de 11% con dietas a base de harina de chícharo (30%), harina de pescado (23%), harina de trigo (23%) y harina de camarón (4%) (Cruz-Suarez *et al.*, 2001), donde la harina de chícharo fue pretratada (descascarillado, extruido, micronizado y descascarillado y extruido) mayores a las reportadas con el pos-acondicionamiento del presente experimento, excepto por la dieta donde es extruida la harina de chícharo, probablemente debido a la gelatinización de los almidones del chícharo como ocurre con el pos-acondicionamiento en autoclave.

Por otro lado la PMS fue superior a los valores reportados por Cruz Suárez *et al.* (2002) obtenidos para los alimentos comerciales en México (2.5-5%), de igual manera que con aquellos valores reportados por Fox *et al.* (1995) para la determinación del requerimiento de Lys en las dietas con las cuales determinaron el requerimiento de Lys (a base de 25% de gluten de trigo y 20% de pescado, PMS de 3.4%)

La PPC para la dieta deficiente en Met chícharo verde 1 procesada de manera tradicional fue semejante a la encontrada en los experimentos 7 y 8 utilizando como base la dieta deficiente en Met chícharo verde 2 (13%), sin embargo al implementar el pos-acondicionamiento en la dietas la PPC se reduce en su totalidad, pero al incluir la DL-Met encapsulada en CMC la PPC se reduce a solo una sexta parte. La PPC en la dieta deficiente en Met chícharo verde 1 procesada de forma tradicional fue mayor a los valores determinados en el experimento1 con dietas experimentales procesadas industrialmente (8.8-9.5%) y en el experimento5 con el MN (6.0-10.5%), sin embargo en las dietas pos-acondicionadas y adicionadas con DL-Met encapsulada en agar la PPC

resultó menor que las del experimento 1 y semejantes a los valores de la dieta comercial y suplementadas con 0.9 y 1.35% de Lys en el experimento 5, las cuales fueron evaluadas por el mismo método. En los alimentos comerciales en México (Cruz-Suárez *et al.*, 2002) se reportó un amplio rango de PPC (0-10%) atribuida al error experimental y al uso de tecnologías de recubrimiento con lípidos. Los resultados obtenidos en el presente experimento, demuestran que el tipo de proceso de peletizado y el tipo de almidones, así como la presencia de AAL también afectan la PPC. Por otro lado Lim (1993) determinó un valor de 22% de PPC para las dietas experimentales donde evaluó la utilización de los AA en una dieta semipura (20% de calamar+ 6% de cacahuate, con 13% de la proteína dietaria) adicionada con 16% de AAL (para obtener un 28% de proteína dietaria) a diferentes niveles de pH (mediante el método Dominy y Lim, 1991).

La PE en la dieta deficiente en Met chícharo verde 1 procesada de manera tradicional (19%) fue un poco menor a la PE encontrada en el experimento 1 con dietas experimentales de fabricación industrial (22-24%); por otro lado es semejante a los valores superiores (17-19%) reportados en alimentos comerciales en México reportados por Cruz Suarez *et al.* (2002). La PE en la dieta pos-acondicionada (10%) coincide con la mayoría de los resultados reportados para alimentos comerciales mexicanos (Cruz-Suárez *et al.*, 2002) y representa una reducción del 50% con respecto al proceso tradicional, aunque la suplementación de DL-Met encapsulada en CMC solo reduce en un 25% la PE (14%).

Las pérdidas de Met, Lys y Arg en el presente experimento siguieron el mismo patrón que las PPC y PE, se redujeron con la implementación del pos-acondicionamiento, pero la suplementación de DL-Met encapsulada en CMC incrementó la PAA. La DL-Met encapsulada en CMC por el método japonés (Millamena *et al.*, 1996a; Alam *et al.*, 2004a; Hernandez, 2010) se lixivió en su totalidad.

Las pérdidas de Met (20%), Lys (25%) y Arg (22%) con la dieta deficiente en Met chícharo verde 1 procesada de manera tradicional en el presente experimento son consistentes con las PAA en la dieta encontradas en los experimentos 5 y 7, aunque la PLys fue ligeramente superior; además corresponden con los valores reportados por Ricque *et al.* (2006) para una fórmula comercial. Las PAA se redujeron (60, 30 y 55%,

respectivamente) con la dieta pos-acondicionada, pero con la suplementación de la DL-Met encapsulada en CMC volvieron a incrementarse las PMet y PLys a los niveles de la dieta sin pos-acondicionar, aunque la PArg continuó disminuida (40%). La PMet reportada por Lim (1993) con dietas experimentales semipuras fue de 53%, cuando se suplementó 0.55% de la dieta, lo que concuerda con lo encontrado en las dietas suplementadas con Met encapsulada en el presente estudio; en la misma dirección Fogle *et al.* (1999) encontraron una pérdida del 40% de la DL-Met adicionada (0.4%) a los 15 min en una dieta para camarón a base de pasta de soya, trigo y pescado procesada industrialmente.

La PMet encapsulada corresponde a un 30% de la PPC en donde se suplemento, aunque la CMC con el proceso de pos-acondicionamiento pudo verse afectada en su capacidad aglutinante, permitir la difusión de agua hacia el pelet y favorecer en la lixiviación de nutrientes que repercutieron en el incremento de la PPC, PE y PAA. En contraste Alam *et al.* (2004b) estudiaron la encapsulación de AAC con diferentes polímeros, de los cuales la CMC presento una de las más bajas PAA totales a los 10 y 30 minutos (2.3 y 4.5%) de AA en la dieta en una dieta a base de harina de pescado (40%) y una mezcla de AAC (13.7%), con un buen crecimiento en *M. Japonicus*, solo por debajo de bajo de una dieta comercial. Alam *et al.* (2005) presentaron el primer reporte en medir la lixiviación (15min) de sus encapsulados en un estudio de requerimiento de AA, sobre una dieta a base de Aislado de soya y calmar peletizada en un molino cárnico; reportaron 11% de PMet para la dieta suplementada con AAC sin encapsular y un 30% menos con la encapsulación en CMC, que contrasta de nuevo con los resultados reportados en los experimentos 7 y 8 con DL-Met libre y en el presente experimento con la DL-Met encapsulada en agar. Huai *et al.* (2009b) en la determinación del requerimiento de Thr mediante una dieta extruida industrialmente, a base de pescado (20%), gluten de trigo (25%) y AAC (7%) (método de Dominy y Lim, 1991), obtuvieron pérdidas de Met, Lys y Arg de 6, 11 y 5% para los 30 minutos de inmersión y de 17, 14 y 10% a los 60 minutos de inmersión.

7.10.3 Resultados Zootécnicos

Con base en los resultados obtenidos del experimento 7 y 8 donde la dieta resultaba lo suficientemente deficiente como para evitar el crecimiento de los camarones e incluso causar mortalidad sobre aquel lote de animales, a la semejanza de las dieta deficiente en Met chícharo 1 y 2, a una mejor Suv de los camarones utilizados en el experimento de digestibilidad con un origen distinto (Nayarit) y a una respuesta significativa sobre la Suv con la suplementación en exceso de Met encapsulada en agar. En el presente experimento se podría esperar una mejora en la Suv de los camarones alimentados con la dieta suplementada con DL-Met encapsulada en CMC al completar el requerimiento de camarón y al usar jaulas para descartar el efecto del canibalismo sobre los parámetros zootécnicos.

La Suv del presente experimento decayó con respecto a la duración del bioensayo de crecimiento (de 73 a 93%, a los 35 días) como en los experimentos previos. Adicionalmente la Suv mejoró con camarones procedentes de Veracruz con respecto a los valores obtenidos en los experimentos 5 (58-81%, 42 días), 7 (75-83%, 14 días) y 8 (46-87%, en 35 días) con animales procedentes de Sinaloa; experimentos donde se atribuyó la baja Suv y el canibalismo como una respuesta a la gran deficiencia en Met de las dietas para esa línea genética.

Los parámetros zootécnicos acumulados hasta el día 35, tomando al tanque y después al individuo como unidades experimentales no mostraron diferencias significativas, sin importar los diferentes procesos a los que se sometió la dieta. El crecimiento con las dietas experimentales fue pobre (TCE de 0.49-0.74) con respecto a los crecimiento en los experimentos 1, 2, 5 y 7 (TCE >3.00); incluso menor al crecimiento obtenido en el experimento 8 (TCE 1.04-1.26%), en el cual se implementó el uso de jaulas individuales (Vazquez-Añon and Giesen, 2004).

El cálculo de los parámetros zootécnicos de forma semanal arrojó un escaso crecimiento durante la primera semana del bioensayo, a partir de ese momento la GP se mantuvo oscilante alrededor de 0. La sustitución de la dieta pos-acondicionada,

suplementada con Met y espreada con el atrayente por una dieta comercial a partir en la última semana de bioensayo fue capaz de revertir una tendencia negativa en el crecimiento y tener el mayor crecimiento de los tratamientos evaluados, aunque sin ser significativo. La dieta deficiente en Met chícharo verde 1 no promueve el crecimiento de los camarones en jaulas individuales al suplementar la dieta deficiente probablemente debido a una restricción del espacio, sin embargo permite el mantenimiento de los organismos, lo que concuerda con el señalamiento de Fox *et al.* (2006) en el que el requerimiento de camarón podría estar cubierto a niveles de 0.4% de Met (1.33% de proteína) en dietas a base de pasta de soya y en este caso a base de pasta de soya y chícharo, apoyado por los resultados de Forster y Dominy (2006). Por otra parte los requerimiento de Met de 0.7-0.89% (2.9-2.4% de proteína, respectivamente) (Millamena *et al.*, 1996a; Richard *et al.*, 2009) para *P. monodon*, de 0.9 (2% de proteína) para *P. varians* (Palma *et al.*, 2006) y de 0.65% (1.32% de proteína) para *M. japonicus* (Teshima *et al.*, 2002) han sido mayores.

7.11 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de *L. vannamei*

(Experimento 11)

7.11.1 Análisis químico de las dietas

Las dietas extremo a base de proteína de chícharo y de pescado son nutricionalmente muy distintas y no conservan el mismo núcleo de ingredientes, ya que estuvieron diseñadas para presentar un mismo contenido de nitrógeno y de energía y por ello es que este experimento no corresponde a una evaluación del reemplazo de harina de pescado por harina de chícharo.

A pesar de que el objetivo de que las dietas extremo a base de proteína de chícharo y de pescado fueran isoproteicas e isoenergéticas se cumplió, las dietas intermedias con un porcentaje de sustitución la dieta a base de chícharo por la de pescado

tuvieron una disminución significativa en la energía. Los contenidos del perfil de AA concordaron con lo esperado, de manera tal que la deficiencia en Met y en Thr se fue desvaneciendo gradualmente con la sustitución por fórmula de proteína de pescado. Con lo anterior el alimento a base de chícharo presentó una deficiencia de Met (61%) y de Thr (8%) con respecto al 22% de proteína de carcas de *L. vannamei*, mientras los contenidos de Met y Thr fueron menores (en 96% y 9%, respectivamente) considerando las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) para 22% de proteína. La inclusión de chícharo permitió exitosamente conseguir niveles muy bajos en Met y evitar la deficiencia en Lys señalada por Biswas *et al.* (2007) sin embargo lleva una tendencia a presentar deficiencias en Thr que es otro AA con un rol metabólico de mucha importancia (Huai *et al.*, 2009b). Considerando las deficiencias observadas en los alimentos evaluados en el presente experimento, la dieta 40PCh: 60%PP debería generar una respuesta positiva en el crecimiento del camarón sobre el resto de las dietas.

Los valores $\delta^{15}\text{N}$ en las harinas de chícharo ($1.5.0 \pm 0.4\text{‰}$) y de pescado ($16.6 \pm 0.1 \text{‰}$) fueron lo suficientemente contrastantes como para poder formular las dietas experimentales con un amplio rango de valores $\delta^{15}\text{N}$ y a su vez explorar los efectos de dietas bajas en proteína sobre el cambio isotópico en el músculo de camarón.

7.11.2 Análisis físico de las dietas

La ABS de las dietas no presentó diferencias significativas, muy probablemente debido a que se balancearon las dos fórmulas extremo para obtener dietas con un contenido semejante de almidones. Por una parte el chícharo represento el 85% de la dieta con un contenido de alrededor de 55% de almidones (Hickling, 2003) mientras que en el otro extremo se empleo almidón de trigo para diluir la proteína del pescado obteniendo niveles muy parecidos de Fibra+ ELN (54.3 vs. 49.7%). La calidad y la cantidad de almidones permitieron que se utilizaran como aglutinante en las dietas y a su vez que el proceso los gelatinizará de forma semejante. Cruz-Suárez *et al.* (2006) han reportado que una menor ABS de agua en los alimentos se ha asociado con un mayor

grado de cocción en los almidones, además de una mejor compactación de las dietas y esto a su vez genera un menor grado de PMS. En el presente experimento los valores de ABS resultaron menores a los encontrados en los experimentos anteriores, pero se encuentran dentro del rango de lo reportado en otros estudios del mismo laboratorio en alimentos experimentales para camarón por encima del 100% a los 60 minutos de inmersión (Cruz-Suárez *et al.*, 2002; Cruz-Suárez *et al.*, 2006; Ricque-Marie *et al.*, 2006).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la ABS, las dietas con los niveles más elevados de proteína de chícharo si presentaron un incremento en la PMS. En estudios para alimentación humana se ha descrito que el chícharo presenta una gran cantidad de azúcares solubles en agua, precisamente esta característica se emplea para concentrar la cantidad de proteína y reducir el contenido de antinutricionales como preámbulo a la cocción de la semilla (Bishnoi and Khetarpaul, 1994). Las pruebas de fabricación para mejorar la estabilidad y estandarizar el pH de las dietas remarcaron la importancia de controlar la esa fracción de azúcares. Después de 60 minutos de inmersión en el agua todos los alimentos presentaron una PMS menor al 12%, lo que implicó una leve mejora en la estabilidad de los alimentos con respecto a los fabricados en experimentos previos. Por otra parte la dieta 100% proteína de pescado presentó características físicas más favorables, al grado de reducir la PMS a niveles presentes en dietas comerciales en estudios relacionados (Dominy and Lim, 1991; Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Cruz-Suárez *et al.*, 2002; Cruz-Suárez *et al.*, 2006).

Los valores de PPC a pesar de presentar diferencias significativas entre las dietas con diferentes proporciones de proteína de chícharo y de pescado no siguieron una tendencia clara. La PPC encontrada para el conjunto de las dietas se encuentra por encima de los valores reportados para dietas semejantes (Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Cruz-Suárez *et al.*, 2002; Cruz-Suárez *et al.*, 2006). Por el contrario la PE en los alimentos mostró una correlación positiva con la PMS a excepción de la dieta 100% PP. Lo que refuerza nuestra hipótesis de que la mayor parte de la PMS está vinculada a la pérdida de carbohidratos que representan una parte importante de la fórmula a base proteína de chícharo. En las dietas la PPC deja espacios que son ocupados por agua y reduce las

fuerzas moleculares del pellet, lo que favorece a que otros nutrientes menos solubles tengan una pérdida paulatina y ello incrementa la PMS en forma continua.

7.11.3 Resultados Zootécnicos

La tasa de crecimiento estuvo asociada al tratamiento dietario, presentando una correlación negativa con el contenido de proteína del chícharo ($r^2 = -0.94$), el cual indica que el perfil de AA del chícharo no satisface por completo los requerimientos del camarón cuando se incluye en grandes cantidades en la dieta (Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2002). Generalmente se considera que un nivel adecuado de proteína es por encima de 32% para los juveniles de Penaeidos (Kureshy and Davis, 2002). La presencia de anti nutricionales se ha reportado en las harinas de chícharo; sin embargo en el presente experimento no se reportaron efectos negativos debido a que se evitan mediante el proceso de pos-acondicionamiento. El crecimiento observado en los camarones alimentados con la dieta 100% proteína de pescado (TCE = 4.17 o $k = 0.042$) se considera adecuado para postlarvas de *L. vannamei* (Tacon *et al.*, 2002; Vazquez-Añón *et al.*, 2006), a pesar del bajo contenido de proteína. Bautista y Teruel sugieren el uso de hasta un 25% de harina de chícharo en dietas prácticas para un uso eficiente por *P. monodon* sin efectos adversos en el crecimiento. Las bajas tasas de crecimiento observadas en los camarones alimentados con altos contenidos de proteína de chícharo pueden estar relacionadas con la baja disponibilidad de AAI (Met y Thr) en el ingrediente. Sin embargo la GP y la tasa metabólica de nitrógeno observada en el resto de las dietas fueron suficientes para asegurar un cambio en los valores isotópicos ($\delta^{15}\text{N}$) del músculo de camarón. El músculo del camarón comprende alrededor del 66% del peso corporal en camarones penaeidos y estudios previos en crustáceos han mostrado pequeñas diferencias en las razones isotópicas entre muestras del músculo y del cuerpo entero del camarón (Stenroth *et al.*, 2006; Gamboa-Delgado and Le Vay, 2009b). El músculo es un buen tejido en el estudio del trazado del nitrógeno isotópico y permite la comparación con otros estudios (Beltrán *et al.*, 2009; Gamboa-Delgado and Le Vay, 2009b; Buchheister and Latour, 2010; McMahon *et al.*, 2010).

7.11.4 Resultados de la Discriminación isotópica

Los valores isotópicos de cada dieta fueron rápidamente reflejados en el músculo de camarón y el equilibrio isotópico se logró entre los días 15 y 20 del experimento. Los camarones alimentados con las dietas 100PCh, 95PCh/5PP and 85PCh/15PP tuvieron un GP de 65-78%; sin embargo estos animales también alcanzaron el equilibrio isotópico pero evidentemente no a través del incremento en biomasa, sino del recambio metabólico.

Los factores de discriminación isotópica fueron muy contrastantes de 0.5 ‰ (con la dieta a base de 100%PP) a 7.4 ‰ (con la dieta a base de 100%PCh). Estos factores de discriminación estuvieron fuertemente correlacionados ($r^2 = 0.94$) con la inclusión de harina de chícharo en las dietas. Los estudios sobre la dinámica de los isótopos consideran que diferentes factores de discriminación entre organismos consumidores y dietas podrían estar asociados a la calidad del nitrógeno dietario (Roth and Hobson, 2000; Robbins *et al.*, 2005), pero estudios previos apuntan a que la cantidad es lo que provoca diferentes factores de discriminación (Pearson *et al.*, 2003). Independientemente de la causa (cantidad o calidad de la proteína en la dieta), hay un incremento en los factores de discriminación que indica una elevada demanda de nutrientes específicos, en particular cuando la tasa de crecimiento del consumidor es alta, como la observada en los estadios tempranos de vida (Le Vay and Gamboa-Delgado, 2010). Martínez del Rio and Wolf (2005) consideran que la deficiencia de un nutriente dietario específico podría incrementar la tasa de consumo, causando un aumento de la tasa metabólica de los nutrientes no esenciales y así obtener mayores factores de discriminación isotópica entre el tejido animal y la dieta.

Las tasas de recambio metabólico en el músculo de camarón bajo las distintas dietas oscilaron entre 0.014 y 0.078 días⁻¹, aunque no hubo una correlación entre la cantidad de harina de chícharo en la dieta y las tasas de recambio del nitrógeno observadas. El crecimiento corporal puede verse comprometido alimentando con dietas con bajos niveles de proteína, sin embargo esto es imposible en las funciones metabólicas, por lo que los AA suministrados tienen como primer destino el equilibrio metabólico y esto incrementa las tasas de recambio metabólico (Waterlow, 2006). Las

tasa más bajas de recambio metabólico de nitrógeno fueron para las dietas con 70PCh/30PP, 55PCh/45PP y 40PCh/60PP, la última fue la única que pudo expresar un crecimiento comparable con la dieta con 100% de proteína de pescado. Las dietas con 100% proteína de chícharo o de pescado fueron la que presentaron las tasas más altas de recambio metabólico (0.053 y 0.048 días⁻¹ respectivamente).

La medida en la que un rápido recambio metabólico de nitrógeno podría limitar el crecimiento del camarón está en función de la demanda de energía y AA necesarios para la síntesis de proteína (Millward *et al.*, 1975). En pos-larvas y juveniles de penaeidos las tasas de síntesis proteica son característicamente altas, por ejemplo Mente *et al.* (2002) determinó una eficiencia de retención de síntesis de proteína en forma de crecimiento de 94%, cuando *L. vannamei* es alimentado con dietas nutricionalmente optimas, sugiriendo un recambio metabólico muy bajo.

El costo energético es substancial con tasas de recambio elevadas y síntesis de proteína (Waterlow, 2006), en el presente experimento la energía dietaria no fue una limitante, debido a que todas las dietas fueron formuladas con buenos niveles de calorías, producto del uso de carbohidratos altamente digestibles para esta especie de camarón (Cousin *et al.*, 1996). Los tiempos medios de retención del nitrógeno (t_{50}) en el tejido de camarón fueron de 7.4 (dieta 95PCh/5PP) a 17.6 días (dieta 70PCh/30PP) y no estuvo correlacionado con el crecimiento. Usualmente altas tasas de recambio metabólico se traducen en tiempo cortos de retención (Hobson and Clark, 1992), sin embargo lo tiempos de retención en el experimento fueron relativamente altos al compararlos con otros tejidos en crustáceos (*e.g.* hepatopáncreas y proteínas de la hemolinfa). Las tasas de recambio metabólico en tejidos específicos pueden permitir a los investigadores estimar la escala de tiempo para cumplir sus objetivos de estudio (Buchheister and Latour, 2010).

7.11.5 Resultados de la Contribución de Nitrógeno y Materia Seca

Aunque las proporciones estimadas de nitrógeno dietario y materia seca, otorgadas por las harinas de chícharo y pescado fueron muy semejantes a las contribuciones esperadas por la formulación de la dieta, las diferentes tasas de crecimiento funcionan como indicador de las diferentes propiedades nutricionales de las dietas experimentales. El bajo crecimiento presentado en los tratamientos con 100% de proteína de chícharo o altas proporciones de ésta es consistente con estudios donde se reportan pobres crecimientos y el uso de altos contenidos de fuentes de proteína vegetal (Galvani *et al.*, 1988; Paripatananont *et al.*, 2002; Molina-Poveda and Morales, 2004).

La cantidad y perfil de AA de la harina de pescado se considera nutricionalmente bueno para los camarones penaeidos, mientras que los contenidos y perfiles de las fuentes de proteína vegetal (soya y chícharo) por si solas no soportan crecimientos semejantes. En este contexto se ha señalado que el tejido animal generalmente no refleja el valor isotópico de la dieta, pero si refleja el valor isotópico de los nutrientes que tomó para su síntesis (Gannes *et al.*, 1997). Aunque los crecimientos fueron bajos debido a la restricción de proteína, las contribuciones de nitrógeno de la harina de chícharo hacia el músculo de camarón fueron altas y consistentes con las cantidades de nitrógeno disponible en las formulaciones con excepción de la dieta 70PCh/30PP; la cual incorporó cantidades significativamente altas de nitrógeno (78%) y materia seca (86%) de la harina de chícharo, con respecto a lo esperado en la formulación (69 y 91% respectivamente). La harina de chícharo tiene bajos contenidos de proteína, por lo que se requiere incorporar fisiológicamente grandes cantidades de este ingrediente para alcanzar las contribuciones de nitrógeno obtenidas en el presente estudio.

En experimentos previos, explorando las contribuciones dietarias de nitrógeno en pos-larvas de camarón, Gamboa-Delgado y Le Vay (2009b) observaron diferencias significativas cuando la harina de pescado (72% de contribución) y la proteína de soya (28% de contribución) fueron incluidas en dietas con proporciones semejantes de nitrógeno de ambos ingredientes (50:50) formuladas con 46% de proteína. Los resultados indicaron una pobre contribución del nitrógeno de la proteína de soya al crecimiento y

una desproporcionada contribución de la harina de pescado a ese nivel de proteína dietaria. En el presente estudio se ha confirmado el uso potencial de la harina de chícharo (*Pisum sativum*) con los altos niveles de nitrógeno aportados al músculo de camarón, además de ser bien utilizado su contenido de carbohidratos como fuente de energía (Catacutan, 1991; Cruz-Suárez *et al.*, 1994).

7.12 Discusiones Globales

En este apartado se presenta un análisis horizontal de la composición y del grado de deficiencia de Met en las dietas formuladas en la tesis, considerando el contenido de AA totales y digestibles de los ingredientes y la PAA de las dietas generada por lixiviación y su relación con los resultados zootécnicos obtenidos (en los casos donde todos estos datos están disponibles). Adicionalmente se analiza y discute el contenido y posible efecto de la Cys y de la colina en nuestras dietas, como ahorradores de Met. Se discute el posible impacto sobre los resultados, de la duración de bioensayo y tasa de alimentación. Finalmente, se hacen algunas recomendaciones para el diseño de formulas deficientes para camarón a base de proteínas intactas para futuros estudios de sobre los requerimientos de AA usando el método dosis respuesta.

7.12.1 Análisis de la formulación de las dietas

En esta tesis se elaboraron 14 dietas control con diferentes grados de deficiencia de Met que se pueden agrupar en tres tipos de dietas en función de los ingredientes usados como principal fuente de proteína: 1) 4 formulas a base de soya y trigo, 2) 4 a base de chícharo (amarillo o verde), soya, y trigo y 3) 6 a base de chícharo y pescado.

Como premisa uno, las dietas fueron formuladas exclusivamente a base de ingredientes prácticos no hidrolizados es decir a base de los AA estructurales de la proteína de los ingredientes (Tabla 55). Esto, con la finalidad de disminuir al máximo los

problemas originados por la rápida lixiviación de los AAC, y para tener formulas representativas de alimentos prácticos, considerando así, las interacciones físicas de los AA constitutivos de los ingredientes en dietas prácticas, y la tasa de asimilación inherente (Fox *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 2006). Así, mismo para tener una mayor certidumbre sobre el verdadero AA deficiente en el alimento justo antes de ser consumido.

Como premisa 2, para formular las dietas deficientes en Met se utilizó la estrategia inicial de formular usando las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) e ingredientes prácticos con un bajo contenido de ese AA, que al combinarlos entre sí cubrieran los requerimientos de los otros AAI, con un contenido de proteína entre 30 y 35% (Tabla 56). De esta forma se encontró que los ingredientes más deficientes en Met en orden de disponibilidad y uso en acuicultura son la pasta soya, el chícharo y el lupino.

Dado que la pasta de soya es el ingrediente más usado para sustituir la HP en alimentos comerciales y es deficiente en Met respecto al perfil recomendado por Akiyama *et al.* (1991) como se muestra en las Figuras 86 y 87, al principio se desarrollaron cuatro formulas deficientes en Met a base de soya y trigo, con un contenido teórico de Met de entre 0.58 y 0.39% y deficiencias de entre 20 y 48%.

Para definir la dieta deficiente soya 1, se partió de una formula comercial, disminuyendo a 10% el contenido de harina de pescado e incrementando el contenido de soya a 46% y dejando los demás ingredientes constantes, Con esto se logró una deficiencia de Met de 20 % y un contenido teórico digestible de 0.56% de la dieta . A pesar de ello, el consumo de esta dieta no afectó el crecimiento, ni la Suv de los camarones que la consumieron durante 28 días, con respecto a aquellos alimentados con una dieta control externo comercial. En base a este resultado se concluyó que el nivel de Met recomendado por Akiyama *et al.* (1991) es sobreestimado al menos en un 20% (debe ser menor a 0.58% digestible en lugar de 0.72%) y por lo tanto para conseguir una dieta realmente deficiente, habría que buscar un contenido de Met dietario menor.

Entonces la formula de Soya 1 se simplificó usando exclusivamente pasta y aislado de soya y harina y gluten de trigo, que son los ingredientes vegetales prácticos usados preferentemente por su disponibilidad y precio. Con estos cambios en la formula

se redujo la proteína de 33 a 30% hasta obtener, en la dieta Soya 4 un contenido de Met analizado de 0.43%, que corregido por su coeficiente de digestibilidad sería de 0.42% y corregido por la lixiviación sería de 0.32% de la dieta (Tablas 58,59 y 60). Obteniendo deficiencias de 37 a 49% con respecto Akiyama *et al.* (1991) considerando la digestibilidad de la dieta y el 26% de PMet encontrada por lixiviación después de 1 hora de inmersión en agua. Con el consumo de esta dieta deficiente soya 4, la Suv de los camarones fue afectada de manera progresiva con el tiempo de experimentación pasando de un 83 a un 63% de los 28 a los 42 días de experimentación. Esta baja Suv no se presentó en los camarones que consumieron la misma fórmula pero suplementada con DL-Met encapsulada en agar, concluyéndose que la mortalidad fue causada por la deficiencia en Met. Sin embargo, como la adición de Lys después de agregar la Met mejoró numéricamente el crecimiento y considerando la referencia de Biswas *et al* (2007) y el perfil de carcas de *L. vannamei*, la formula soya 4 también estaría deficiente en Lys, por lo que se decidió mejorar la formula incrementando a 35% el porcentaje de proteína en la dieta y agregando harina de chícharo que además de ser deficiente en Met es rica en Lys; de esta forma se pasó al segundo grupo de formulas a base de chícharo/soya /trigo.

Las formulas chícharo verde 1 y 2 a base de chícharo/soya/trigo, presentaron una estabilidad en el agua globalmente similar a las de soya/trigo, (promedio 13% de PMS) con pérdidas de Met y Lys un poco menores del orden del 19 y 18% después de 1 hora de inmersión en agua. Los contenidos de Met (de 0.37 y 0.42% analizados, 0.35 y 0.40 corregidos por su coeficiente de digestibilidad y de 0.28 y 0.32 corregidos además por su lixiviación) fueron similares o un poco menores a las dietas soya/trigo, pero con niveles de Lys analizados mayores (1.81-2.05%) (1.77-2.00% corregidos por su coeficiente de digestibilidad y 1.33-1.64% corregidos por su tasa de lixiviación). El consumo de estas dietas al igual que la soya 4 causo mortalidad desde los 14 días, a pesar de realizar un bioensayo en jaulas individuales; pero en este caso la adición de productos de DL Met sin encapsular, o de Met encapsulada en CMC no mejoraron la Suv, posiblemente por su lixiviación total a los 15 min de inmersión en agua.

Cabe mencionar que la principal diferencia con respecto a las formulas soya/trigo deficientes usadas por otros investigadores en estudios previos para la evaluación de

productos de Met (Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006; Browdy *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2011), es el no haber incluido AAC adicionales para dejar a la Met como el único AA deficiente.

Los estudios de lixiviación nos permitieron mostrar que a pesar de formular con ingredientes intactos, existen pérdidas por lixiviación de AA solubles presentes en los ingredientes y que el grado de lixiviación o de solubilidad es mayor en AA esenciales como Lys y Met lo que puede ocasionar deficiencia prematura antes del consumo, si no se cuenta con un alimento estable, atrayente y una buena frecuencia de alimentación.

Con base a estos resultados los estudios previos reportados para la determinación de requerimiento de AA en *P. monodon* (Chen *et al.*, 1992b; Millamena *et al.*, 1996b; Millamena *et al.*, 1996a; Millamena *et al.*, 1997; Millamena *et al.*, 1998; Millamena *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2009), *M. japonicus* (Teshima *et al.*, 2002) donde se incluyeron otros AAC además del AA evaluado, podrían ser cuestionados especialmente cuando la estabilidad de los AA en la dieta no fue reportada.

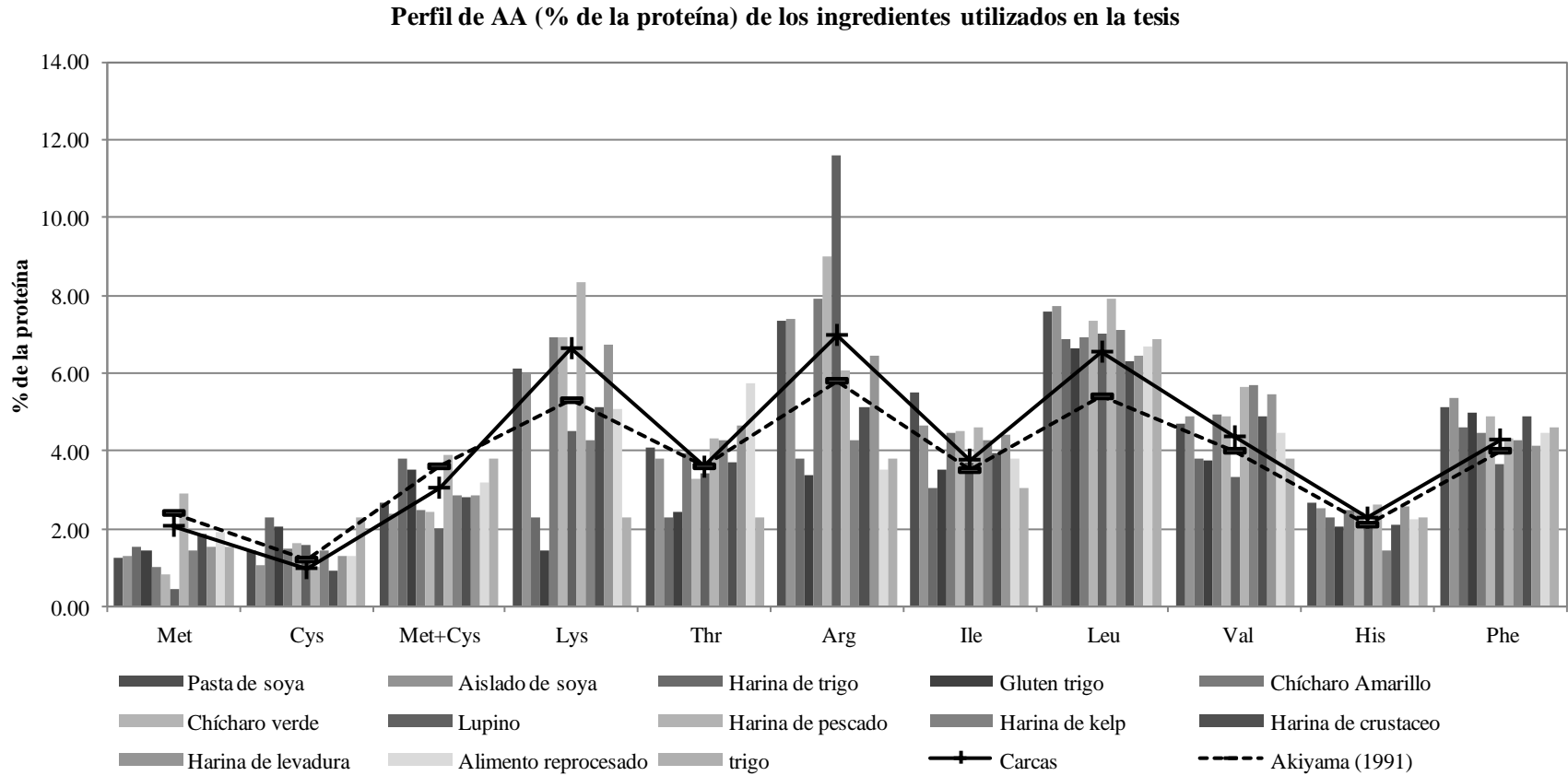


Figura 86. Comparación de los perfiles de AA del carcas de *L. vannamei*, del recomendado por Akiyama *et al.* (1991) y de los ingredientes utilizados en la formulación de dietas para el presente trabajo.

Perfil de AA digestibles (% de la proteína) de los ingredientes utilizados en la tesis

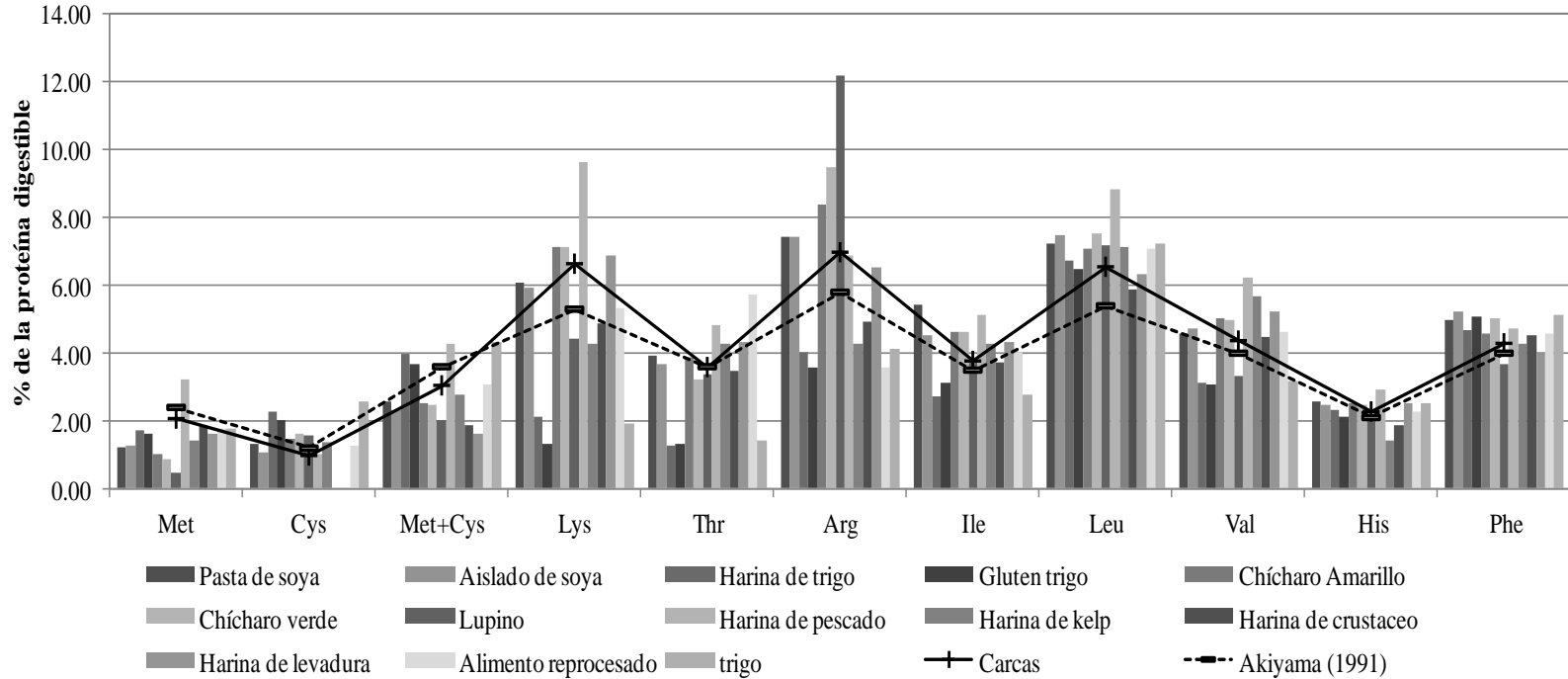


Figura 87. Comparación de los perfiles de AA del carcas de *L. vannamei*, del recomendado por Akiyama *et al.* (1991) y de los AA digestibles de los ingredientes utilizados en el presente trabajo, calculados a partir de los coeficientes de digestibilidad reportados para pasta y aislado de soya (Cruz-Suárez *et al.*, 2009); harina de trigo, gluten de trigo y trigo entero (Nieto-López *et al.*, 2011); chícharo (Thiessen *et al.*, 2003); lupino (Smith *et al.*, 2007); harinas de pescado, kelp, crustáceo, levadura y alimento reprocesado (Villareal Cavazos, 2011).

Tabla 55. Comparación global de las fórmulas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.

Ingrediente (g/Kg dieta)	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento 6		Experimentos	Experimentos	Experimento 11	
	1	2	3	5	Dieta164	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Deficiente	100%
	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Deficiente	(Cruz-Suarez	Chicharo	Chicharo	Chicharo	Chicharo	proteína de
	Soya1	Soya2	Soya3	Met-Lys	et al, 2006)	Amarillo 2	verde 1	verde 2	verde 3	pescado
Hidroxi análogo de metionina-calcio	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuente de Met (DL-Met: agar) ‡, †	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
Fuente de Met (DL-Met libre) *	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-
Fuente de Lys (LysHCl: agar) *, †	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
Agar-Agar †	-	-	-	44.5	-	-	-	-	-	-
Pasta de soya ‡	458.3	300	400	400.0	430	200	316.9	317.8	-	-
Aislado de soya (Prolise isolate 5001) §	-	94.9	48.4	73.8	-	138.2	80	80	-	-
Harina de trigo Manitoba ‡	200	487.6	424.6	362.6	183.2	-	100	100	-	-
Gluten de trigo ††	-	10	10	10.0	-	-	10	10	-	-
Harina de chicharo entero Amarillo*	-	-	-	-	100	490	-	-	-	-
Harina de chicharo entero verde†	-	-	-	-	-	-	360	360	849.2	-
Harina de pescado prime	100	-	-	-	15	15	5	5	-	323.2
Harina de Lupino	-	-	-	-	97.1	-	-	-	-	-
Trigo	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harina de crustáceo	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levadura	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harina de Kelp	20	-	-	-	40	20	-	-	-	-
Alimento procesado	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceite de soya *	-	26.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceite de pescado	30	-	45	45	32.4	14	41.4	41	47.7	46
Lecitina de soya §	41	41	22	30	44.1	69.3	31.5	31	33.7	25.5
Almidón de trigo ††	-	-	10	-	-	-	-	-	-	449.5
α-celulosa §	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90
Carboximetil celulosa (CMC 50000) ††	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-
Acido alginico (alta viscosidad) **	-	-	-	-	25	25	25	25	15	25
Aqua savor **	-	10	10	10.0	-	-	-	-	10	10
Fosfato monocalcio ¶¶	-	10	20	13.3	-	-	10	10	29.2	18.6
Oxido de Cromo (99%) ▯	-	10	-	-	-	-	7	7	-	-
Vitamina C Basf 35% §§	-	0.5	0.3	0.3	0.5	0.5	-	-	-	-
CaCl2 §	-	-	-	-	15.1	10	7	7	7	7
Colesterol (Solvay) ††	-	3.1	3.2	4.0	2.4	2.8	1	1	3	0
Premezcla de vitaminas §§	3.7	2.5	2.5	2.5	3	3	2.5	2.5	2.5	2.5
Premezcla de minerales §§	1.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.5	2	2	2	2
Inhibidor de hongos §§	0.3	0.5	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Antioxidante (ETQ) §§	0.2	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E ▯	-	-	0.5	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Met total	6	4.4	4	4.2	3.9	4	4	4	1.8	6.2
Lys total	20			1.7	22.4	21.2	20.7	20.6	14.9	18.6

x Indica la fuente de Met con que fue suplementada la dieta

La tabla 56 muestra el contenido proximal analizado de las dietas deficientes en Met evaluadas en la presente tesis. Se puede apreciar que las dietas deficientes a base de las mezclas de productos vegetales fueron diseñadas para cumplir con los niveles recomendados de proteína, lípidos y energía que marca la literatura (Akiyama *et al.*, 1991; Cruz-Suarez *et al.*, 2000; Cruz-Suárez *et al.*, 2002).

La composición de las primeras dietas a base mezclas de soya, trigo y chícharo con contenidos de 30 a 35% de proteína, de 7 a 10% de lípidos presentan una composición proximal semejante a otros estudios donde se reporta la evaluación de dietas deficientes en Met para *L. vannamei* (Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006; Velasquez *et al.*, 2011), en los cuales no se encontró una mejora en el crecimiento del camarón por la suplementación de alguna fuente sintética de Met. Sin embargo, Nunes *et al.* (2010) reportan que en una dieta a base de soya y harina de trigo, con un contenido de 39% de proteína y 9 a 10% de lípidos el crecimiento de *L. vannamei* aumentó al suplementar MHA.

Tabla 56. Composición proximal (% bh) de las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.

g/100g de dieta	Experimento	Experimento	Experimento				Experimento	Experimento	Experimentos 7			Experimento 11					100% proteína de pescado
	1	2	Experimento 5	Experimento 6		9	10	y 8	Pe		Ch			Pe			
	Deficiente Soya1	Deficiente Soya2	Deficiente Met-Lys	Dieta164 (Cruz-Suarez et al, 2006)	Deficiente Chicharo Amarillo 2	Deficiente Chicharo verde 1	Deficiente	Chicharo verde 1	Deficiente Chicharo verde 2	Deficiente Chicharo verde 3	Ch95 Pe5	Ch85 Pe15	Ch70 Pe30	Ch55 Pe45	Ch40 Pe60		
Humedad	8.39	13	11.8	9	7.4	10	10.6	10.1	9.58	11.1	11.1	10.7	10.4	9.96	10.2	9.89	
Proteína	33.2	30	30.6	32.4	31.5	32	35.1	33.2	34.5	20.2	20.2	21.2	21.5	22.2	22.7	24.4	
Lípidos	9	10.3	10.5	10	10.6	8.8	7.12	8.14	7.12	7.92	7.85	7.71	8.59	8.41	8.26	7.65	
Ceniza	6.74	5.26	4.82	8.8	7.9	4.7	6.55	5.25	6.55	6.44	6.44	6.67	6.94	7.28	7.6	8.41	
Lípidos+ Fibra + ELN	51.7	1.56					1.79		1.79	1.01	1.11	1.83	2.65	3.46	4.3	6.6	
ELN		40					40.5		40.4	53.3	53.3	51.9	49.9	48.7	46.9	43.1	
Fibra + ELN	42.7	41.56	42.3	39.8	42.6	44.5	42.29	43.3	42.19	54.31	54.41	53.73	52.55	52.16	51.2	49.7	
Energía (Kcal/g)	4.97	4.11	4.68	4.5	4.4	4.7	4.55	4.84	4.76	4.59	4.51	4.65	4.44	4.41	4.73		

ELN es el extracto libre de nitrógeno

Tabla 57. Contenido teórico de AA crudos, colina y AA digestibles en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.

(g/100g de dieta)	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento 6		Experimentos	Experimentos	Experimento 11					100% Proteína de pescado	
	1	2	3	5	Experimento 6		6, 9 y 10	7 y 8	Experimento 11						
	Deficiente Soya1	Deficiente Soya2	Deficiente Soya3	Deficiente Met-Lys	Dieta164 (Cruz-Suarez, 2006)	Deficiente Chícharo Amarillo 2	Deficiente Chícharo verde 1	Deficiente Chícharo verde 2	Deficiente Chícharo verde 3	95PCh : 5PP	85PCh : 15PP	70PCh : 30PP	55PCh : 45PP		40PCh : 60PP
Met	0.58	0.39	0.39	0.41	0.37	0.40	0.39	0.39	0.17	0.19	0.24	0.31	0.38	0.46	0.65
Cys	0.51	0.46	0.47	0.47	0.47	0.42	0.49	0.49	0.34	0.33	0.32	0.31	0.29	0.27	0.23
AAS	1.09	0.85	0.86	0.88	0.84	0.83	0.88	0.88	0.51	0.53	0.56	0.62	0.67	0.73	0.87
Lys	2.20	1.53	1.58	1.69	1.78	2.07	2.03	2.04	1.44	1.47	1.51	1.57	1.64	1.70	1.87
Thr	1.44	1.07	1.10	1.16	1.20	1.29	1.24	1.24	0.68	0.69	0.72	0.77	0.81	0.85	0.97
Arg	2.35	1.94	1.98	2.11	2.39	2.43	2.53	2.53	1.87	1.84	1.79	1.71	1.64	1.56	1.36
Ile	1.79	1.40	1.47	1.54	1.55	1.57	1.65	1.65	0.93	0.94	0.95	0.96	0.98	0.99	1.03
Leu	2.68	2.22	2.23	2.34	2.31	2.42	2.51	2.52	1.53	1.54	1.57	1.60	1.64	1.68	1.78
Val	1.72	1.35	1.36	1.43	1.40	1.58	1.59	1.59	1.02	1.03	1.06	1.09	1.13	1.16	1.26
His	0.92	0.75	0.77	0.80	0.79	0.82	0.85	0.85	0.51	0.51	0.52	0.53	0.54	0.55	0.58
Phe	1.74	1.51	1.51	1.59	1.49	1.61	1.70	1.70	1.02	1.02	1.01	1.00	1.00	0.99	0.97
Gly	1.66	1.24	1.25	1.31	1.32	1.39	1.41	1.41	0.85	0.87	0.92	0.98	1.05	1.12	1.29
Ser	1.67	1.51	1.51	1.59	1.54	1.53	1.59	1.59	0.76	0.77	0.78	0.79	0.80	0.81	0.84
Pro	1.93	1.95	1.90	1.92	1.71	1.51	1.72	1.73	0.85	0.85	0.85	0.86	0.86	0.86	0.87
Ala	1.69	1.22	1.24	1.31	1.32	1.41	1.43	1.43	0.85	0.87	0.92	0.99	1.06	1.13	1.33
Asp	3.65	2.96	3.02	3.25	3.37	3.76	3.71	3.71	2.29	2.28	2.26	2.23	2.19	2.16	2.07
Glu	6.66	6.80	6.65	6.80	6.23	5.86	6.41	6.42	3.31	3.28	3.23	3.14	3.06	2.97	2.75
Trp	0.42	0.37	0.38	0.41	0.35	0.38	0.40	0.40	0.17	0.17	0.18	0.19	0.20	0.20	0.23
Tyr	0.24				0.26	0.32	0.29	0.29	0.59	0.60	0.62	0.65	0.68	0.70	0.78
Cys/Met	0.87	1.16	1.20	1.16	1.28	1.05	1.25	1.25	2.00	1.72	1.34	0.98	0.75	0.60	0.35
Colina	0.10	0.16	0.18	0.17	0.16	0.11	0.13	0.13	0.06	0.07	0.08	0.09	0.11	0.12	0.16

Los contenidos de colina en la dietas fueron estimados a partir de los contenidos de colina reportados en para los ingredientes proteicos y lecitina de soya, omitiendo el aporte de aceite de pescado (INRA, 2006; Cruz-Suarez *et al.*, 2009; FONDAGRO 2006).

Continuación Tabla 57

(g/100g de dieta)	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento 6		Experimentos	Experimentos	Experimento 11					100% proteína de pescado	
	1	2	3	5	Dieta164 (Cruz-Suarez et al, 2006)	Deficiente Chícharo Amarillo 2	6, 9 y 10	7 y 8	Deficiente Chícharo verde 3	95PCh : 5PP	85PCh : 15PP	70PCh : 30PP	55PCh : 45PP		40PCh : 60PP
Met	0.56	0.38	0.38	0.39	0.36	0.39	0.38	0.38	0.16	0.18	0.23	0.30	0.37	0.44	0.63
Cys	0.44	0.42	0.42	0.43	0.43	0.39	0.45	0.45	0.31	0.31	0.29	0.28	0.26	0.24	0.20
AAS	1.00	0.80	0.80	0.82	0.79	0.78	0.83	0.83	0.47	0.49	0.52	0.58	0.63	0.68	0.82
Lys	2.12	1.46	1.51	1.62	1.71	1.99	1.95	1.95	1.35	1.38	1.43	1.50	1.58	1.65	1.86
Thr	1.31	0.93	0.97	1.04	1.10	1.19	1.13	1.13	0.61	0.62	0.66	0.70	0.75	0.80	0.93
Arg	2.29	1.90	1.94	2.07	2.36	2.37	2.47	2.47	1.79	1.77	1.72	1.65	1.58	1.52	1.33
Ile	1.68	1.30	1.37	1.45	1.48	1.50	1.56	1.56	0.88	0.88	0.90	0.91	0.93	0.95	0.99
Leu	2.50	2.05	2.06	2.17	2.17	2.27	2.34	2.35	1.42	1.44	1.46	1.51	1.55	1.59	1.71
Val	1.59	1.22	1.24	1.31	1.31	1.49	1.48	1.48	0.95	0.96	0.98	1.02	1.06	1.10	1.20
His	0.87	0.71	0.72	0.76	0.75	0.78	0.80	0.80	0.47	0.47	0.48	0.50	0.51	0.53	0.56
Phe	1.63	1.42	1.42	1.50	1.41	1.53	1.60	1.60	0.95	0.95	0.94	0.94	0.93	0.93	0.91
Gly	1.48	1.20	1.22	1.28	1.27	1.32	1.36	1.36	0.78	0.78	0.78	0.79	0.79	0.80	0.81
Ser	1.49	1.36	1.37	1.45	1.43	1.43	1.47	1.47	0.70	0.70	0.69	0.68	0.68	0.67	0.65
Pro	1.83	1.93	1.88	1.89	1.67	1.45	1.67	1.67	0.78	0.77	0.76	0.75	0.73	0.72	0.68
Ala	1.48	1.10	1.14	1.21	1.24	1.33	1.34	1.34	0.78	0.79	0.80	0.83	0.85	0.88	0.94
Asp	3.32	2.74	2.81	3.05	3.19	3.57	3.50	3.51	2.10	2.07	2.02	1.95	1.87	1.79	1.59
Glu	6.41	6.72	6.56	6.70	6.08	5.63	6.20	6.21	3.03	3.00	2.93	2.83	2.73	2.63	2.36
Trp								0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tyr					0.21		0.23	0.23	0.54	0.52	0.46	0.38	0.30	0.22	0.00
Cys/Met	0.79	1.09	1.12	1.09	1.21	1.02	1.19	1.19	1.93	1.65	1.27	0.92	0.70	0.55	0.31

Considerando que las dietas deficientes soya 1 y 2 tenían un contenido de Met digestible teórico de 0.56 y 0.38% y que generaron una TCE y Suv buenas y similares en los camarones que las consumieron, además de que la dieta deficiente soya 1 no presentó diferencias con el control externo comercial, resulta evidente que los valores de Met recomendados por Akiyama *et al.* (1991) son sobreestimados y que con 0.38% de Met digestible y con 1.00 a 0.80 de AAS digestibles en presencia de fuentes de colina como lecitina de soya (4.1% de la dieta) con y sin aceite de pescado se estaría cubriendo el requerimiento. Esto también podría explicar la ausencia de respuesta al agregar MHA en esas dietas. Sin embargo, la dieta soya 4, con contenidos similares de Met a la soya 2 produjo una mortalidad significativa que se manifestó después de los 28 días de experimentación. Entonces, la falta de respuesta con la dieta soya 2 pudo deberse a la corta duración del experimento y por lo tanto el tiempo de experimentación parece ser un factor determinante para que los efectos de la deficiencia se manifiesten.

Por otra parte, Biswas *et al.* (2007) reportaron que la Lys (no la Met) es el primer AA limitante en formulas a base de soya, cuando se utiliza como referencia el carcas de *P. monodon*, lo que contrasta con el perfil de AA recomendado por Akiyama *et al.* (1991) y el reportado para el carcas de *L. vannamei* en el presente trabajo, donde el primer AA limitante es la Met para la pasta y el aislado de soya (Figuras 86 y 87). Por otro lado el perfil de AA del carcas de *L. vannamei* indica que la necesidad de Met es un 14% menor, pero las necesidades de Lys, Arg y Leu son mayores en 25, 20 y 21%, con respecto a las recomendaciones de Akiyama *et al.* (1991) como se aprecia.

Con la experiencia de las dietas deficientes soya 2 y 3, la dieta soya 4 (deficiente Met-Lys) fue formulada de manera semejante presentando un contenido teórico de 0.41% de Met y analizado de 0.43%, mostrando deficiencias de 44 y 35% con respecto a los perfiles de Akiyama *et al.* (1991) y carcas de camarón; el contenido de Met digestible no fue muy diferente 0.42%, lo que corresponde a deficiencias de 46 y 27% usando los mismos perfiles (Tablas 58 y 59). A pesar de considerarse una proteína íntegra, los ingredientes de este tipo de dietas a base de productos de soya y trigo presentaron un alto porcentaje de PAA (Ricque-Marie *et al.*, 2006), como resultado la dieta deficiente Lys-Met quedó con un 0.32% de Met digestible y estable, después de 15 minutos de

inmersión en el agua (Tabla 60 y Figura 90). A diferencia de las dietas deficientes soya 1 y 2, la dieta soya 4 deficiente Lys-Met, causó una reducción en la Suv pero hasta los 42 días de experimentación, presumiblemente como un signo del desbalance de los AA en la proteína dietaria (Millamena *et al.*, 1997), que se corrigió con la adición de 0.4% de Met encapsulada en agar.

Por otra parte con la fórmula soya deficiente 2 se hizo una sustitución total de productos marinos, inclusive reemplazando el aceite de pescado con colesterol sintético y aceite de soya, manteniendo un nivel adecuado de lípidos y energía para el crecimiento de los camarones, que fue adecuado con respecto al obtenido con la fórmula deficiente soya 1. La lecitina es un ingrediente constante en las formulaciones utilizadas en el presente trabajo, debido a que representa una buena fuente de fosfolípidos y ácidos grasos para el camarón, aunque también contribuye con un contenido importante de colina (Gurkin and Orthofer, 1993). Aunque en animales terrestres y algunos peces se conocía que la colina es un ahorrador de Met en procesos metabólicos como donador de metilos (Tacon, 1987b; Wilson, 2003), no fue hasta hace unos meses atrás Richard *et al.* (2011) reportó un efecto ahorrador de hasta 50% de Met para *P. monodon*, siempre y cuando se cumpla el requerimiento de AAS. Sin embargo el contenido de lecitina en las dietas deficiente soya 3 y soya 4 deficiente Met-Lys se redujo en 50 y 25%, debido a una mayor inclusión de aceite de pescado, presentando un menor contenido de colina y repercutiendo en un menor ahorro de Met para funciones metabólicas (Tabla 55). Lo anterior también podría explicar la baja Suv como un signo de mayor deficiencia en los camarones alimentados con la dieta soya 4 deficiente Met-Lys, a pesar de que el contenido teórico de la fórmula es ligeramente mayor al de la dieta deficiente soya 2 y porque al suplementarla con DL-Met encapsulada en Agar se mejoró la Suv.

Tabla 58. Contenido analizado de AA crudos en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 5	Experimento 6		Experimentos 6, 9 y 10		Experimentos 7 y 8		Experimento 11				
(g/100g de dieta)	Deficiente Soy1	Deficiente Soya2	Deficiente Soya3	Deficiente Met-Lys (soya 4)	Dieta164 (Cruz-Suarez et al, 2006)	Deficiente Chicharo Amarillo 2	Deficiente Chicharo verde 1	Deficiente Chicharo verde 2	Deficiente Chicharo verde 3	95PCh :5PP	85PCh :15PP	70PCh :30PP	55PCh :45PP	40PCh :60PP	100% proteína de pescado
Met				0.43	0.39		0.37	0.42	0.18	0.20	0.25	0.31	0.38	0.44	0.62
Cys				0.53	0.48		0.42	0.46	0.28	0.28	0.27	0.27	0.26	0.25	0.23
AAS				0.96	0.87		0.79	0.88	0.46	0.48	0.52	0.58	0.64	0.69	0.85
Lys				1.45	2.24		1.81	2.05	1.49	1.51	1.55	1.60	1.66	1.71	1.86
Thr				1.31	1.15		1.14	1.24	0.72	0.73	0.76	0.80	0.84	0.88	0.99
Arg				2.16	2.75		2.30	2.50	1.83	1.80	1.75	1.68	1.60	1.52	1.32
Ile				1.55	1.36		1.36	1.46	0.89	0.90	0.92	0.94	0.97	0.99	1.06
Leu				2.72	2.27		2.32	2.51	1.52	1.53	1.56	1.61	1.65	1.69	1.81
Val				1.69	1.41		1.45	1.53	1.01	1.02	1.05	1.09	1.12	1.16	1.26
His				0.79	0.90		0.72	0.82	0.49	0.49	0.50	0.51	0.52	0.53	0.56
Phe				1.78	1.61		1.55	1.68	1.01	1.01	1.01	1.00	1.00	0.99	0.98
Gly				1.47	1.27		1.28	1.39	0.90	0.92	0.96	1.03	1.09	1.16	1.33
Ser				1.74	1.48		1.53	1.64	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.86	0.86
Pro				2.16	1.80		1.66	1.74	0.79	0.80	0.81	0.83	0.85	0.87	0.92
Ala				1.49	1.30		1.28	1.39	0.89	0.91	0.96	1.04	1.11	1.18	1.38
Asp				3.63	3.30		3.37	3.65	2.29	2.28	2.26	2.23	2.20	2.18	2.10
Glu				7.51	5.95		5.88	6.32	3.34	3.32	3.27	3.20	3.12	3.05	2.86
Trp									0.23	0.23	0.24	0.25	0.27	0.28	0.31
Tyr									0.65	0.65	0.66	0.67	0.68	0.69	0.71
Tau									0.07	0.08	0.09	0.10	0.12	0.14	0.18
Cys/Met				1.23	1.23		1.14	1.10	1.56	1.50	1.38	1.20	1.02	0.84	0.37

Contenido analizado de AA relativo al carcass de camarón (%) en las dietas deficientes en Met utilizadas en la tesis

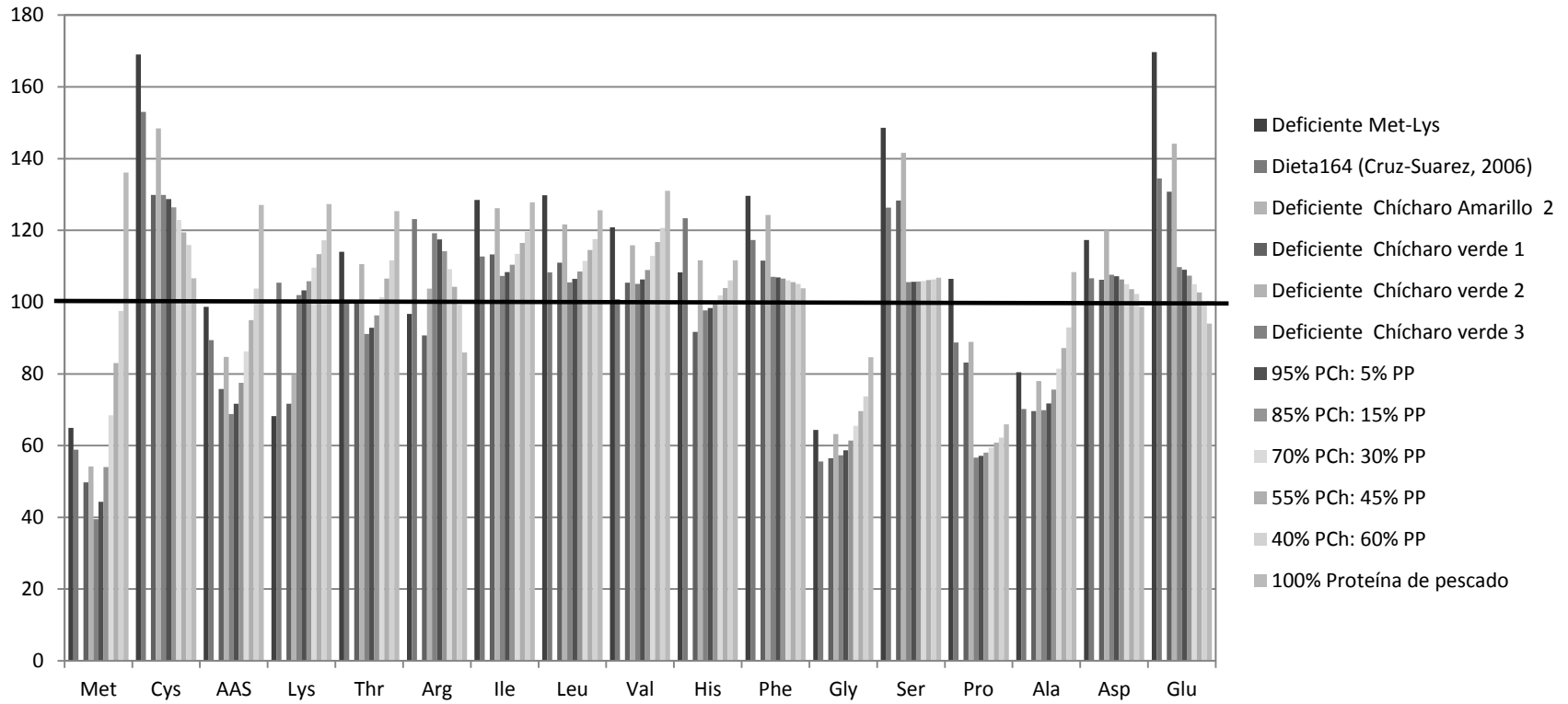


Figura 88. Contenido analizado de AA crudos en las dietas de base deficientes en Met, relativo al de carcas de juveniles de *L. vannamei*.

Tabla 59. Contenido digestible de AA analizados en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.

(g/100g de dieta)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 5	Experimento 6		Experimentos 6, 9 y 10	Experimentos 7 y 8	Experimento 11						100% Proteína de pescado
	Deficiente Soya1	Deficiente Soya2	Deficiente Soya3	Deficiente Met-Lys (Soya 4)	Dieta164 (Cruz-Suarez et al, 2006)	Deficiente Chicharo Amarillo 2	Deficiente Chicharo verde 1	Deficiente Chicharo verde 2	Deficiente Chicharo verde 3	95PC h: 5PP	85PC h: 15PP	70PC h: 30PP	55PC h: 45PP	40PC h: 60PP	
Met				0.42	0.38		0.35	0.40	0.17	0.19	0.24	0.30	0.36	0.43	0.60
Cys				0.48	0.44		0.37	0.40	0.26	0.25	0.25	0.24	0.23	0.22	0.20
AAS				0.90	0.82		0.71	0.80	0.43	0.45	0.48	0.54	0.60	0.65	0.80
Lys				1.39	2.15		1.77	2.00	1.39	1.42	1.46	1.53	1.59	1.66	1.84
Thr				1.16	1.05		1.07	1.16	0.64	0.66	0.69	0.74	0.78	0.83	0.95
Arg				2.12	2.71		2.27	2.46	1.76	1.73	1.69	1.62	1.55	1.48	1.29
Ile				1.45	1.29		1.30	1.40	0.84	0.85	0.86	0.89	0.92	0.95	1.02
Leu				2.52	2.13		2.19	2.37	1.41	1.43	1.46	1.51	1.56	1.61	1.74
Val				1.54	1.32		1.37	1.45	0.94	0.95	0.98	1.02	1.05	1.09	1.20
His				0.75	0.85		0.70	0.79	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.51	0.54
Phe				1.68	1.52		1.48	1.60	0.94	0.94	0.94	0.94	0.93	0.93	0.92
Gly				1.44	1.22		1.26	1.37	0.82	0.82	0.83	0.83	0.83	0.83	0.84
Ser				1.59	1.37		1.43	1.53	0.78	0.77	0.76	0.74	0.73	0.71	0.66
Pro				2.13	1.76		1.63	1.71	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
Ala				1.38	1.22		1.23	1.34	0.81	0.82	0.84	0.86	0.89	0.91	0.98
Asp				3.41	3.12		3.18	3.44	2.10	2.07	2.02	1.95	1.88	1.81	1.62
Glu				7.40	5.81		5.74	6.17	3.06	3.03	2.97	2.88	2.79	2.70	2.46
Cys/Met				1.16	1.16		1.06	1.00	1.50	1.32	1.05	0.80	0.63	0.52	0.33

Contenido digestible de AA analizados relativo al carcass de camarón (%) en las dietas deficientes en Met utilizadas en la tesis

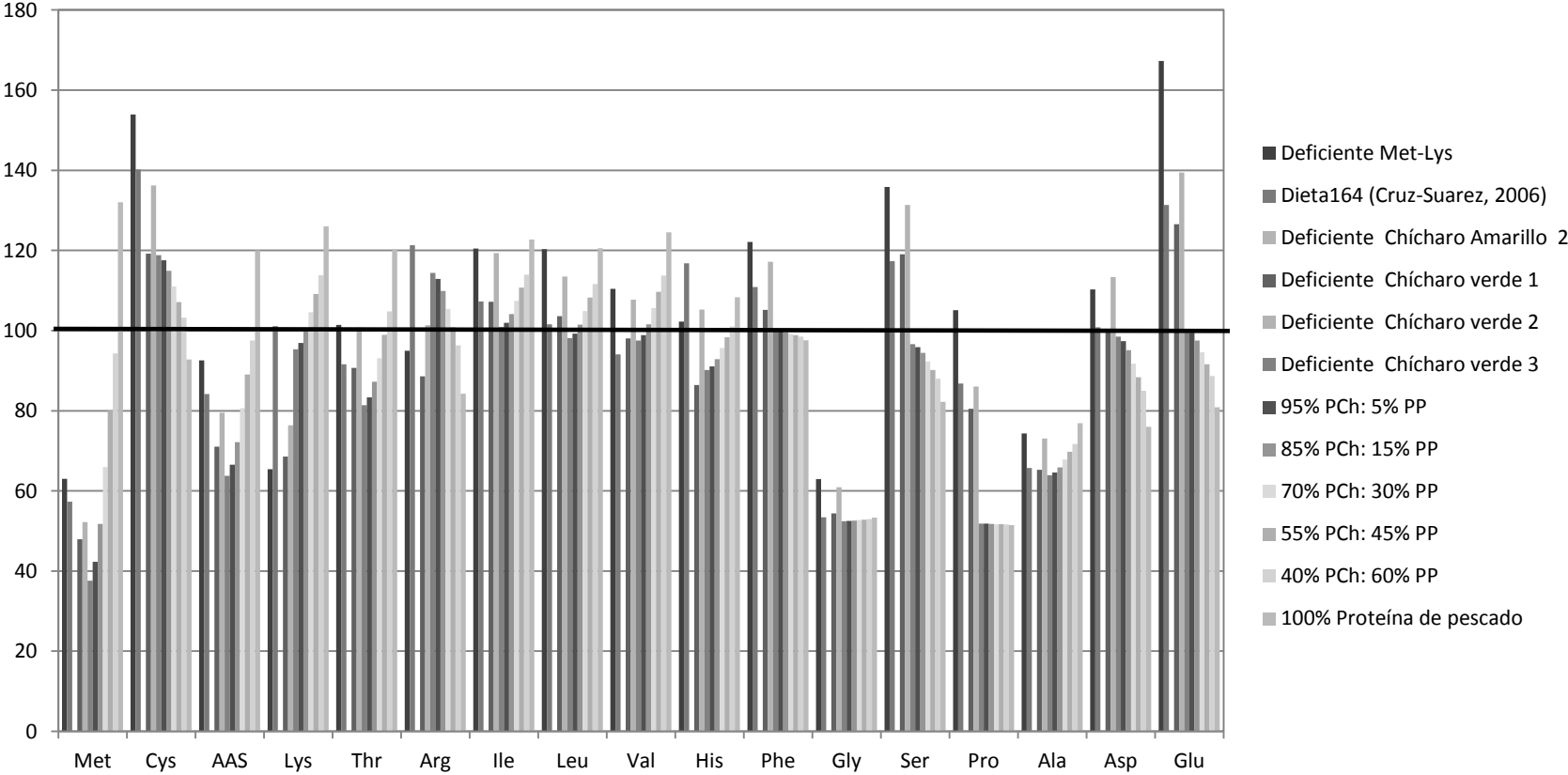


Figura 89. Contenido digestible de AA en las dietas de base deficientes en Met, relativo al de carcas de juveniles de *L. vannamei*.

Tabla 60. Contenido digestible y estable en el agua de AA analizados en las dietas de base deficientes en Met utilizadas en la tesis.

(g/100g de dieta)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 5	Experimento 6		Experimentos 6, 9 y 10	Experimentos 7 y 8	Experimento 11						
	Deficiente Soya1	Deficiente Soya2	Deficiente Soya3	Deficiente Met-Lys (Soya 4)	Dieta164 (Cruz-Suarez et al, 2006)	Deficiente Chícharo Amarillo 2	Deficiente Chícharo verde 1	Deficiente Chícharo verde 2	Deficiente Chícharo verde 3	95PC 5PP	85PC 15PP	70PC 30PP	55PC 45PP	40PC 60PP	100% Proteína de pescado
Met				0.32	0.33		0.28	0.32							
Cys				0.41	0.41		0.32	0.36							
AAS				0.73	0.74		0.60	0.69							
Lys				1.08	1.53		1.33	1.64							
Thr				1.01	1.01		0.96	1.05							
Arg				1.76	1.92		1.78	2.03							
Ile				1.33	1.23		1.16	1.29							
Leu				2.26	2.00		1.96	2.16							
Val				1.36	1.26		1.24	1.35							
His				0.57	0.64		0.58	0.67							
Phe				1.48	1.34		1.30	1.45							
Gly				1.23	1.17		1.13	1.22							
Ser				1.38	1.32		1.25	1.37							
Pro				1.86	1.34		1.48	1.56							
Ala				1.20	1.16		1.10	1.22							
Asp				3.00	2.96		2.77	3.07							
Glu				6.58	5.35		5.04	5.52							
Cys/Met				1.25	1.24		1.15	1.11							

Contenido digestible e hidroestable de AA analizados relativo al carcass de camarón (%) en las dietas deficientes en Met utilizadas en la tesis

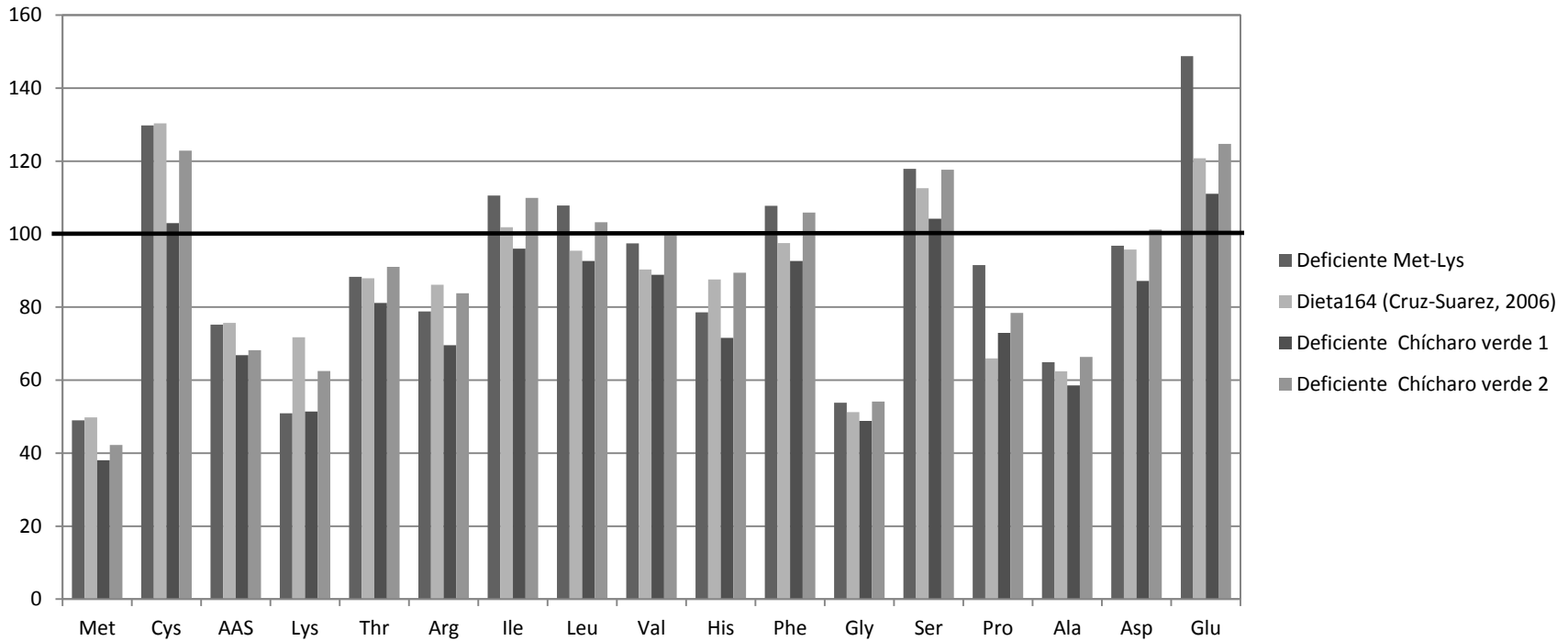


Figura 90. Contenido digestible de AA corregido por lixiviación en las dietas de base deficientes en Met, relativo al de carcas de juveniles de *L. vannamei*.

El segundo grupo de fórmulas a base de soya, trigo y chícharo (Tabla 55), se generó debido a que el perfil de AA del carcas de *L vannamei* sugiere un contenido 25% mayor de Lys en la dieta al recomendado por Akiyama *et al.* (1991) y que los perfiles de AA reportados para el chícharo señalan un alto contenido relativo de Lys (Bhatty and Christison, 1984; Hickling, 2003; Hess *et al.*, 2006; Palander *et al.*, 2006). De esta manera la inclusión de chícharo se utilizó como una fuente de Lys para desarrollar fórmulas con una deficiencia marcada exclusivamente en Met, estrategia que no había sido empleada en estudios de este tipo (Vazquez-Añon and Giesen, 2004; Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006; Browdy *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2011).

A partir de una dieta (164) reportada deficiente en Met (44%) por Cruz-Suárez *et al.* (2006) con un contenido teórico de 0.37% de Met a base de 43% de pasta de soya, 18% de harina de trigo, 10% de harina de chícharo y 10% de harina de lupino, se desarrolló una fórmula deficiente en Met (39%) con un contenido teórico de 0.4%, donde el chícharo amarillo con 49% es el principal ingrediente y no la soya con 20% cubriendo así el nivel de Lys (2.07% de la dieta) en el carcas de camarón (Tabla 57). Aunque el chícharo, a pesar de ser un ingrediente de distribución universal y con una producción creciente, la disponibilidad de las diferentes variedades de este recurso es limitada en el mercado nacional. Basados en la disponibilidad de la variedad verde chícharo forrajero y su similitud nutricional con la variedad amarilla (Hickling, 2003), se desarrollo una fórmula deficiente con 36% chícharo verde, 32% de soya, 8% de aislado de soya, 10% de harina de trigo y 1% de gluten de trigo, adicionalmente solo se agrego 0.5% de pescado como atrayente. Esta última dieta aunque resulta más práctica por la disponibilidad de los ingredientes en el mercado nacional, deriva en un costo relativamente elevado debido a los productos refinados de soya y trigo, así como del chícharo.

A partir de estas tres primeras fórmulas a base productos de soya, trigo y chícharo y considerando las elevadas PAA reportadas para la dieta soya 4 deficiente Met-Lys, la estabilidad de los AA de la proteína integra de los ingredientes de estas dietas cobró relevancia. La dieta 164 (Cruz-Suárez *et al.* 2006) pasa de tener un contenido analizado de 0.39% de Met con una deficiencia exclusivamente en este AA de 41% respecto al

carcas de camarón a un contenido de Met digestible y estable de 0.33% que representa una deficiencia del 50%, mientras la dieta deficiente chícharo verde 1 con un contenido analizado de 0.34% de Met y una deficiencia de 50% presentó solo 0.26% de Met digestible y estable en el agua con una deficiencia de 52% en este AA (Tablas 58 y 60). En consecuencia el contenido de Met digestible y estable en el agua es semejante entre las dietas 164 (Cruz-Suárez *et al.* 2006) y deficiente Met-Lys probablemente debido a la semejanza en la inclusión de soya, mientras que en la dieta deficiente chícharo verde 1 una inclusión dominante de chícharo parece disminuir considerablemente el contenido de Met digestible y estable.

La dieta deficiente chícharo verde 1, posteriormente fue ajustada ligeramente para disminuir el contenido de lípidos en la dieta (lecitina y aceite de soya) remplazándolos por chícharo y dando lugar a la dieta deficiente chícharo verde 2 con un contenido analizado de Met de 0.42% y una deficiencia de 39% respecto al carcas de camarón y presentando un contenido de Met digestible y estable de 0.32%, lo cual representa en la dieta una deficiencia del 53% (Tablas 58 y 59). Debido a la disponibilidad de ingredientes y que la dieta deficiente chícharo verde 1 presentó una buena estabilidad en el agua, únicamente las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2 fueron evaluadas en bioensayos de crecimiento.

Por otra parte los camarones alimentados con las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2 con bajos contenidos de Met (0.37 y 0.42%) y Met digestible (0.35 y 0.40%), presentaron pobres crecimientos y Suv como signo de su deficiencia. Cabe señalar que las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2 presentaron deficiencias de 17 y 6% para Lys cruda y de 19 y 9% para Lys digestible, señalándolo como un segundo limitante. La suplementación de DL-Met libre y encapsulada en CMC en estas dietas no mejoró la Suv de los camarones, a diferencia de lo obtenido con la dieta soya 4 deficiente Met-Lys cuando se suplementó con DL-Met encapsulada en agar.

Por otro lado, muy recientemente Richard *et al.* (2011) han reportado que la Cys y la colina pueden ahorrar hasta un 50% del requerimiento de Met, siempre y cuando se cumpla con el requerimiento de AAS. No obstante que las leguminosas se consideran como deficientes en Met, estas tienen un contenido considerable de Cys relativo a la

proteína, por ende las dietas formuladas a base de proteínas de leguminosas contribuyen con una buena cantidad de AAS en global (Figuras 86 y 87). Sin embargo, las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2 a pesar del alto contenido de Cys total (0.42 y 0.46%) o Cys digestible (0.35 y 0.40%) y de la presencia de otros ahorradores de Met como la colina proveniente de la lecitina de soya (0.01%, teórico), del aceite de pescado y de los ingredientes vegetales (0.12%, teórico), también presentaron deficiencias de 21 y 12% para los AAS crudos y de 29 y 20% para los AAS digestibles (Figuras 90 y 91), con respecto a los niveles del carcas de *L. vannamei*, a lo cual se le atribuye la baja Suv de los camarones alimentados con éstas dietas.

Las dietas a base de proteínas vegetales diseñadas para esta tesis, en general presentan una inclusión importante de lecitina de soya (de 2.0 a 6.9 %) como fuente de fosfolípidos, fosfatidilcolina es uno de los principales, lo cual representa un aporte 0.23% de colina (Gurkin and Orthofer, 1993; FONDAGRO, 2006). De manera que en estudios posteriores se deberá considerar el impacto de la colina en estos lípidos en el estudio dietas deficientes en Met.

Por otra parte las dietas formuladas con productos de soya, trigo y chícharo, presentan un contenido relativamente bajo de harina de trigo, que es utilizada como un aglutinante natural debido a las características estructurales de su almidón, mientras que el chícharo aún cuando tiene un 46% de almidones (Hickling, 2003), una gran parte de ellos es soluble (Bogracheva, 1998), por lo que se incluyó ácido algínico (2.5%), como un aglutinante artificial. La estabilidad de la dieta deficiente chícharo verde 1 se mejoró con un proceso de postcondicionamiento térmico, a altas presiones; lo cual incrementó el grado de gelatinización de los almidones de chícharo (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2010; Kumaraguru Vasagam and Rajkumar, 2011). En contraste con lo reportado por Davis y Arnold (1995) el aumento del grado de gelatinización de los almidones por el proceso térmico a altas presiones de las dieta chícharo verde 1, no mejoró la digestibilidad de los almidones y tampoco de la energía digestible de la dieta. El post-acondicionamiento de la dieta deficiente chícharo verde 1, además de mejorar la estabilidad de la dieta, redujo la PAA de la proteína íntegra de los ingredientes en la

misma; en el caso de la Met aumentó de un contenido de 0.28% a 0.30%.de Met digestible y estable en el agua.

La mala Suv y los pobres crecimientos obtenidos con las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2 aún cuando se mejoró la hidroestabilidad de la dieta y el contenido de AA en la misma, sugirieron que el grado de asimilación de la PC del chícharo por *L vannamei* podría no ser eficiente. Por ello es que se realizó estudio de isótopos estables (Fry and Arnold, 1982; Hesslein *et al.*, 1993; Fry, 2006) y del origen ecológico distinto del chícharo y los productos marinos (Gamboa-Delgado and Le Vay, 2009b, a) considerando que el pescado es un ingrediente que guarda proporciones adecuadas entre los nutrientes, especialmente para organismos marinos carnívoros y omnívoros (Tacon and Metian, 2008).

Lo anterior condujo al tercer grupo de fórmulas, a base de chícharo y pescado (Tabla 55). Considerando que los modelos de contribuciones de dos fuentes de nitrógeno presentan como premisas que las fuentes dietarias debe ser isoproteicas, isoenergéticas y a base de un único ingrediente proteico, además de la poca disponibilidad de productos derivados (concentrado, aislado, etc.) de chícharo a nivel nacional; la dieta de base deficiente chícharo verde 3 fue formulada con un muy elevado contenido de harina de chícharo (85%) aportando un 22% de PC que es bajo para *L vannamei*, mientras que los contenidos de lecitina (48%) y aceite de pescado (33%) fueron ligeramente superiores a los empleados en las formulaciones anteriores, pero con un contenido de lípidos (7.9%) y energía (4.7Kcal/g) adecuado para el crecimiento (Cruz-Suarez et al., 2000; Cruz-Suárez et al., 2006). El contenido proximal de estas dietas se muestra en la Figura 56

La formulación de la dieta deficiente chícharo verde 3, plantea una panorámica diferente en el estudio, donde a partir de la variación en el contenido de proteína, se pueden aumentar la deficiencia del AA de interés, en este caso la Met. La dieta deficiente chícharo verde 3 presenta un contenido de 0.18% de Met cruda y 0.17% de Met digestible, indicando deficiencias de 60 y 62% con respecto al carcas de *L. vannamei*. Sin embargo el chícharo también presenta una deficiencia de 9% en Thr cruda y 11% en Thr digestible, que se traduce en una deficiencia de igual magnitud en ésta última dieta. La fórmula exclusivamente a base de 100%PP presentó un contenido de solo 32% de harina

de pescado y 45% de almidón de trigo y 9% de celulosa para balancear los aportes de proteína, almidón y fibra del chícharo en la dieta deficiente chícharo verde 3. Con la fórmula a base 100%PP se cubrió el contenido de AAI del carcas de *L. vannamei*, con excepción de la Arg que presentó deficiencias de 14 y 16% para el AA crudo y digestible respectivamente; presentó un contenido de 0.62% de Met cruda y 0.60% de Met digestible (Figuras 58 y 59).

A partir de las dietas a base de PCh y PP se desarrollaron 5 dietas con niveles de sustitución de 5, 15, 30, 45 y 60% de la dieta a base de PCh por la de PP. Esta sustitución de la dieta deficiente Chícharo verde 3 por la de pescado mostró un incremento en los contenidos de Met, Thr, Lys, Val Leu, Ile e His, el de Phe se mantuvo constante y los de Arg y Cys decrecieron. No obstante, el primer AA limitante en las dietas hasta con 55%PCh fue la Met presentando contenidos de 0.18 a 0.38% de Met cruda (deficientes de 60 a 17%) y contenidos de 0.17 a 0.43% de Met digestible (deficientes de 62 a 20%).

Los resultados la incorporación relativa del nitrógeno con las fórmulas a base de chícharo y pescado indican que la incorporación de nitrógeno de chícharo al músculo de camarón es equivalente a la incorporación de nitrógeno de pescado o incluso mayor con una proporción 70:30. Lo anterior fue contrario a lo esperado con base en los rendimientos obtenidos con las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2, además del desbalance que presenta la PCh en Met y Thr.

En contraste con las dietas deficientes chícharo verde 1 y 2 que presentaron deficiencias de 42 y 48% de Met digestible (con contenidos de 0.33 y 0.36% en la dieta), la dieta deficiente chícharo verde 3 con una deficiencia de 62% de Met digestible (un contenido de 0.17% en la dieta) produjo una buena Suv (96%) aunque hay que considerar que en este caso el experimento solo fue de 28 días. Recientemente Richard *et al* (2010; 2011) han reportado que el camarón a diferencia de los monogástricos terrestres presentan una gran plasticidad en las enzimas que regulan la actividad metabólica de los AA. Debido a que en este bioensayo se alimento a saciedad, la deficiencia de Met aunque mayor no genero mortalidad temprana quizá por un mayor consumo de alimento, en contraste con el resto de los bioensayos donde se alimento de forma racionada.

7.12.2 Análisis físico de las dietas

En la Tabla 61 se muestra un resumen de la capacidad de absorción de agua y de la estabilidad en el agua de las dietas evaluadas en la presente tesis. Se observa que la ABS de agua marina es menor en el alimento soya 1 (que es el único alimento peletizado) con respecto a los otros alimentos que fueron producidos en un molino de carne en laboratorio. Así mismo que la ABS y la PMS varió en función de las fórmulas y fue mayor en las dietas a base de soya/trigo (159% y 14% soya 4) que en las dietas a base de chícharo/soya/trigo (130% y 13.4% promedio) seguida por las dietas a base de chícharo/pescado (110% promedio y 11.8 a 5.8%) esto cuando se uso el mismo método de lixiviación, La PAA también fue menor con la inclusión del chícharo.

En la Tabla 61, las PMet libre y PMHA corresponden a las pérdidas promedio de las dietas suplementadas con diferentes cantidades de los productos. Fogle *et al.* (1999) reportan una PMHA en alimento para camarón de 44%, la cual concuerda con la pérdida obtenida en la presente tesis (57%), por lo tanto la MHA no es estable en agua. Adicionalmente no hay estudios que indiquen la eficiencia de utilización de la MHA en camarón, como ocurre en monogástricos terrestres. Por lo tanto la MHA resulta poco propicia para ser evaluada como una fuente de Met en estudios dosis-respuesta.

Por otra parte la DL-Met libre suplementada en las dietas se perdió casi por completo después de 15 minutos de inmersión en el agua marina. A diferencia de otros estudios donde la encapsulación en CMC o agar-agar redujo las PAA y permitió definir el requerimiento de estos (Millamena *et al.*, 1996b; Millamena *et al.*, 1996a; Millamena *et al.*, 1997; Millamena *et al.*, 1998; Millamena *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2004b; Alam *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011). En el presente trabajo encapsular DL-Met en agar o CMC y HCl-Lys en agar no evitó la pérdida total de los AA. Por lo que es necesario encontrar fuentes de AA más estables en el agua.

Tabla 61. Resumen de la estabilidad y pérdida de nutrientes en las dietas utilizadas en la tesis a los 60 minutos de inmersión en agua marina.

g/100g	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 5	Experimento 6			Experimento 9			Experimento 10	Experimentos 7 y 8		Experimento 11					100% proteína de pescado
	Deficiente Soya1	Deficiente Soya2	Deficiente Soya3	Deficiente Met-Lys	Dieta 164 (Cruz-Suarez et al, 2006)	Deficiente Chicharo Amarillo 2	Deficiente Chicharo verde 1	Deficiente Chicharo verde 1	Chicharo verde 2	Chicharo verde 3	Ch95 Pe5	Ch85 Pe15	Ch70 Pe30	Ch55 Pe45	Ch40 Pe60				
ABS	92.8	262	221	159	129	137	138	131	88.4	131	105	85.9	126	102	110	101	113		
PMS	20.5	6.94	7.43	15.7 (14)	15.3	13.15	13.8	13.4	13.2	13.4	11.2	11.8	10.6	8.99	7.46	6.87	5.83		
PP	8.8			12.2 (8.4)					12.9-41.2*	12.9	21.4	22.7	25.3	19.5	15.1	20.4	23.1		
PE	21.6								19.4		13.8	13.2	10.8	8.8	5.3	-2.4	14.3		
PMet	41.1	22.7		22 (26)					20.6	19									
PLys	41	54.1		22 (28)					25	18.2									
PArg	30	15.7		17 (16)					21.5	17.3									
Pcys				16 (12)					13.5	9.78									
PDL-Met suplementada				97.3 (96.5)					100	93									
PMHA	57.3																		

Los valores entre paréntesis corresponden al momento a partir del cual se implemento el método nuevo de lixiviación.

* Es el rango de valores reportado a partir de los análisis de proteína de Degussa y Maricultura respectivamente.

7.12.3 Parámetros zootécnicos

Al analizar los resultados zootécnicos de las dietas de base evaluadas en el presente trabajo, se encontró que la dieta deficiente soya 1 con una fórmula estilo comercial y un contenido de 0.6% de Met y 1.1% de AAS en la dieta parece satisfacer los requerimientos del camarón. De manera que la recomendación de Akiyama *et al.* (1991) parece estar sobreestimada como se ha reportado en estudios anteriores (Forster and Dominy, 2006; Fox *et al.*, 2006).

Por otro lado las dietas soya 4 (deficiente Met-Lys) y deficientes chícharo verde 1 y 2 con un contenido de 0.4% de Met en la dieta mostraron una baja Suv, relacionada con signos de canibalismo en los experimentos 5 y 8, propiciando una disminución en la densidad de carga y por ende un incremento en la talla de los camarones y distorsionando los parámetros zootécnicos asociados a este, llegando a conclusiones erradas. Así mismo, en los experimentos 8 y 10 realizados en jaulas también se apreció una disminución en la Suv y se descartó el origen de los animales como la causa. Debido a que la Suv tiene un impacto directo sobre el resto de los parámetros zootécnicos, se debe considerar como el primer signo de deficiencia en una dieta, en este sentido Millamena *et al.* (1996a) reportan que la Suv se ve disminuida como resultado del desbalance de AA y se mejora conforme este balance se atenúa, la Suv mejora.

Los AAC suplementados libres o encapsulados en una matriz de Agar o CMC son completamente solubles en el agua marina a partir de los 15 minutos. Lo que plantea la necesidad de desarrollar fuentes de Met que sean estables al sumergir el alimento en el agua marina y asimilables por el camarón. Es interesante remarcar que a pesar de esto con la Met encapsulada en Agar se observó una mejor Suv.

En el experimento 11, donde se formularon dos dietas exclusivamente desarrolladas a base de proteína de chícharo o de pescado con un bajo contenido de proteína (22%), y un reemplazo gradual de la dieta de chícharo por la de pescado acompañado de un incremento en el contenido de Met de 0.18 a 0.62% de la dieta como primer AA limitante (un contenido relativo al perfil de AA del carcas de *L vannamei* de

40 a 136%); se observó que la incorporación de N de ambas proteínas al N del músculo de camarón era equivalente. Sin embargo la Suv no se vio afectada a tan bajos contenidos de Met en la dieta y con valores relativos de Met inferiores al de carcas del camarón. Esto puede ser explicado por la duración del experimento, pero especialmente al régimen de alimentación, debido a una compensación generada en este experimento en particular, ya que se alimentó a saciedad. Mientras que en los experimentos previos se alimentó de forma racionada para evitar una compensación por cantidad de Met ingerida por día. Lo antes mencionado puede ser sustentado por reportes muy recientes en *P. monodon*, donde se ha observado una plasticidad metabólica en la actividad de las enzimas ligadas al anabolismo y catabolismo de AA (Richard *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2011)

A pesar de que la incorporación del N de la harina de pescado y del chícharo al músculo de *L. vannamei* parece ser equitativa, el incremento en peso aumenta conforme se incluye más pescado, en función de un mejor balance de los AA, como se discutió anteriormente, donde la relación 40% de proteína de chícharo: 60% proteína de pescado presenta un perfil de AA muy semejante al del carcas de camarón.

Como recomendaciones para futuros estudios consideramos que es necesario trabajar con valores de AA digestibles, reportando la estabilidad de los AA de la dieta y de los productos a evaluar, usando niveles de proteína bajos, alimentación a saciedad y experimentos largos de 6 a 8 semanas, usando siempre un control comercial externo.

También es importante definir la relación Met/Cys en la dieta, los AAS y delimitar los ingredientes que pueden afectar indirectamente la definición del requerimiento de Met como colina, taurina, betaina.

Tabla 62. Resumen de los parámetros zootécnicos obtenidos en función de las dietas de base utilizadas en la tesis.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 5	Experimento 7	Experimento 8	Experimento 10	Experimento 11						
	Deficiente Soya1	Deficiente Soya2	Deficiente Met-Lys	Deficiente Chícharo verde 2	Deficiente Chícharo verde 2	Deficiente Chícharo verde 1	Deficiente Chícharo verde 3	Ch95 Pe5	Ch85 Pe15	Ch70 Pe30	Ch55 Pe45	Ch40 Pe60	100% proteína de pescado
Tiempo de Experimentación (días)	28	28	42	14	28	42				29			
Peso inicial(g)	0.77	0.39	0.71	0.6	0.97	0.67				0.14			
Peso final(g)	2.22	1.57	2.98	0.99	1.41	0.83	0.23	0.25	0.25	0.31	0.36	0.41	0.47
Gpeso (%)	186	303	322	65	46	22	65	78	78	121	156	193	236
TCE	3.74	3.98	3.42	3.57	1.26	0.46	1.71	1.99	1.97	2.74	3.23	3.68	4.17
Suv (%)	98	83	63	78	47	73	96	93	93	96	93	100	89
Biomasa (g)	24.4	15.7	24.5	6.14	3.34	3.05	2.01	2.09	2.07	2.71	2.98	3.70	3.77
Consumo (g/ind)bh	2.36	2.71	4.83	0.87	1.56	1.01							
Consumo (g/ind) bs			4.26	0.79	1.41	1.01							
Consumo (g/ind) lix MT			3.59										
Consumo (g/ind) lix MN			3.84	0.74	1.23	0.79							
TCA	1.65	2.30	2.14	2.27	3.85	7.01							
TCAbs			1.89	2.05	3.57	6.31							
TCAlix MT			1.59										
TCAlix MN			1.71	1.91	3.03	5.47							
TEP maricultura	1.74	1.60	1.98	1.29	0.74	0.43							
TEP Degussa			1.89										
UNP Maricultura			0.44										
UNP Degussa	0.22	0.28	0.40										
UNMet			0.60										
UNLys			0.48										

8. CONCLUSIONES

8.1 Efecto de hidroxí análogo de Met-Ca en dos alimentos deficientes; uno comercial y otro experimental (Experimentos 1 y 2)

La suplementación de Met en forma de MHA en un alimento tipo comercial (con un contenido teórico de 0.58% de Met, 0.51% de Cys y 1.09% de AAS) con 20% de deficiencia en Met (con respecto a las recomendaciones de Akiyama *et al.*, 2001) con 0.09% de colina teórica de los ingredientes proteicos y 0.01% de la lecitina de soya no mejoró el rendimiento de los camarones. El hidroxianálogo de Met tiene propiedades atrayentes que aumentan el consumo y pero su pérdida en el alimento es de 57% a los 60 minutos de inmersión en agua marina.

El nivel de 44% de deficiencia de Met (con un contenido teórico de 0.39% de Met, 0.46% de Cys, 0.85% de AAS y 0.16% de colina de los ingredientes proteicos y de lecitina de soya) con respecto al nivel recomendado por Akiyama *et al.* (1991) no redujo la Suv a 28 días de experimentación. La suplementación de 0.36% de MHA no mejoró el rendimiento. Los altos niveles de lixiviación de MHA, descartan a este producto como una buena fuente de suplementación de Met.

La disminución en un 20 % de Met en una dieta de tipo comercial (0.72%) no disminuyó el rendimiento de los camarones en 28 días de experimentación con respecto al rendimiento producido con un alimento comercial, con lo que se concluye que la recomendación de Akiyama *et al.* (1991) esta sobrestimada al menos en un 20%.

8.2 Efecto de encapsulación de DL-Met en agar (Experimento 3)

El encapsulamiento de DL-Met en agar conduce a una reducción de 40% en la PMS en una dieta soya/trigo con una relación 1:1 de agar:AA. Los contenidos relativos de Met en el agua de lixiviación y en la materia seca recuperada después de la inmersión en el agua son complementarios con respecto al contenido inicial determinado en el alimento por la metodología empleada, lo que conduce a determinar tasas de lixiviación equivalentes. La ventaja de hacer el análisis en el agua de lixiviación es que no se requiere de hidrólisis previa como en el alimento. La disminución en la tasa de lixiviación de la Met encapsulada con agar (1:1), evaluada en la dieta soya/trigo, puede ser útil para la determinación del requerimiento de Met mediante un ensayo dosis respuesta. Por el contrario, el exceso de agar y el pre-condicionamiento disminuyeron la estabilidad de la dieta.

8.3 Perfil de AA de carcas de *L. vannamei* como patrón de referencia (Experimento 4)

El perfil de AA obtenido a partir del cuerpo entero del camarón de diferente talla y producido en diferentes condiciones de cultivo fue muy constante. El patrón promedio de AA encontrado se correlacionó bien con otros perfiles reportados en la literatura para cuerpo entero de camarón, músculo de camarón, el límite superior de harinas de camarón y las recomendaciones para la industria. Los aminoácidos dietarios más limitantes, Met, Lys y Arg, muestran grandes diferencias con respecto a las recomendaciones de Akiyama: la Met es sobreestimada en relación al patrón de AA de referencia, pero Lys y Arg son subestimadas, mientras la relación Arg/Lys fue cercana a 1. La diferencia entre los valores del patrón de AA de referencia y del requerimiento de Thr en juveniles de *L. vannamei* (5%) es más estrecha que la encontrada con los valores del requerimiento de Lys (28%). Apoyado en los resultados previos, el perfil de AA obtenido a partir del cuerpo entero del camarón puede ser utilizado como patrón de referencia para el estudio de los requerimientos de AA.

8.4 Efecto de Met y Lys encapsuladas en agar en un alimento deficiente a base de soya/trigo (Experimento 5)

La tasa de lixiviación más importante de los nutrientes del alimento se da dentro de los primeros 15 minutos de inmersión en agua marina. Existe una lixiviación importante de los AA de la proteína de los ingredientes que constituyen el alimento, a pesar de ser ingredientes de origen vegetal que no presentan un alto contenido de AAL, siendo Lys y Met los que más se pierden de los AAI.

La Met y la Lys cristalinas encapsuladas en agar y suplementadas en el alimento soya/trigo, se lixiviaron casi en su totalidad en los primeros 15 minutos de inmersión en el agua; a pesar de ello, su inclusión en los alimentos experimentales fue capaz de inducir una respuesta significativa en la Suv: la deficiencia de 37% de Met (con 0.43% de Met total y 0.42% de Met digestible en la dieta) causó mortalidad y la suplementación de Met a un nivel de (0.91% de Met total) 2.94% de PC disminuyó el problema, mientras que el exceso de Lys a partir de 9.35% (de la PC) también afectó negativamente la Suv.

La Suv es un parámetro que genera efectos significativos que distorsionan la información sobre otros parámetros zootécnicos. En esta formulación a base de soya/trigo (con 0.16% de colina aportada por los ingredientes proteicos y 0.01% de la lecitina de soya) como la utilizada en el presente experimento, la Met parece ser el primer AA limitante, considerando un contenido de Met, Cys y AAS digestibles de 0.42, 0.48 y 0.90 y que corregidos por su estabilidad en el agua serían de 0.32, 0.41 y 0.73% de la dieta.

8.5

8.6 Efecto de sustitución de chícharo verde por amarillo sobre la estabilidad de la dieta

(Experimento 6)

La magnitud de los valores de PMS, al evaluar la estabilidad de los alimentos en el agua, varía de manera significativa dependiendo del método de lixiviación utilizado y la manera de hacer los cálculos, por lo que es necesario implementar entre los investigadores de nutrición de camarón un método estandarizado. Esto disminuirá la dificultad de comparar estudios.

Se concluye que los cambios realizados en la composición de la fórmula 164 utilizada por Cruz-Suárez et al. (2006) excluyendo el lupino, cambiando la variedad de chícharo y agregando algunos otros ingredientes permitieron disminuir la PMS de 15.3 a 13.8%. Por lo que la fórmula desarrollada a base de chícharo verde se considera suficientemente estable y 45% deficiente en Met (con un contenido teórico de 0.38% de Met digestible). Adicionalmente se mejoró el contenido de Lys en la dieta con respecto a la dieta deficiente en Met-Lys pasando de una deficiencia de Lys teórica digestible 24% a una 11% para cubrir los niveles en el carcas de *L vannamei*.

8.7 Efecto de DL-Met libre en un alimento deficiente a base de chícharo verde/soya

evaluado en acuarios y en jaulas (Experimento 7 y 8)

La dieta deficiente en Met chícharo verde 2 empleada en los experimentos 7 y 8 fue 39% deficiente en Met (con un contenido de 0.37% de Met total y 0.35% de Met digestible) con respecto al carcas de camarón y 6% deficiente en Lys (con un contenido de 2.05% de Lys total y 2.00% de Lys digestible).

Después de 15 minutos de inmersión en el agua, las diferencias en el contenido de Met entre los alimentos experimentales se perdió como en los casos anteriores, debido a la lixiviación de la DL-Met suplementada en forma libre. La suplementación de hasta 0.8% de DL-Met libre para exceder el contenido de Met en carcas de camarón no mejoró la Suv. Aparentemente es más eficiente la utilización Met encapsulada en agar que la del AA libre, a pesar de que a los 15 minutos de inmersión ya se ha lixiviado en su totalidad los dos tipos de Met suplementada. El bajo contenido de Met (0.32%) y AAS (0.68%) digestibles y estables en el agua en esta dieta fue la causa de la mortalidad como la observada con respecto a la fórmula soya/trigo del experimento 5. Según lo anterior resulta prioritario mejorar la estabilidad del alimento y de los AA puros adicionados.

El uso de jaulas evitó el canibalismo exitosamente, pero no permitió un buen crecimiento y Suv. Sin embargo la baja Suv obtenida aun con la dieta control comercial no deficiente, en los dos experimentos (sin y con jaula) hace suponer que el lote de camarones con el que se trabajo tenía un problema de calidad.

8.8 Efecto de pos-acondicionar un alimento sobre su estabilidad y digestibilidad

(Experimento 9)

En contraste con las dietas soya/trigo, el proceso de pos-condicionamiento es capaz de disminuir la PMS, la PP y la PE de la dieta deficiente en Met a base de chícharo verde 1, presumiblemente como un efecto de la gelificación de un alto porcentaje de los almidones provenientes principalmente del chícharo. El pos-acondicionamiento reduce de forma muy ligera la DAP de 92-90%, sin embargo parece no alterar la digestibilidad de los almidones, por lo tanto la DAMS y la DAE tampoco presentan diferencias con el proceso. Por otra parte el origen de los camarones no influye sobre la digestibilidad de los alimentos, pero si se aprecia un efecto en la Suv de los mismos.

8.9 Efecto de pos-condicionamiento, DL-metionina-CMC y atrayente comercial sobre

la estabilidad de la dieta y rendimiento de *L. vannamei* (Experimento 10)

La dieta deficiente en Met chícharo verde 1 empleada en el presente experimento fue 44% deficiente en Met (con contenidos de 0.37, 0.42 y 0.79% de Met, Cys y AAS totales que corresponden a 0.28, 0.32 y 0.71% de AA digestibles y estables en el agua). La implementación del proceso de pos-acondicionamiento disminuye la pérdida de nutrientes y de energía eficazmente en una dieta a base de almidones de trigo y chícharo, mientras que la suplementación de AA encapsulados en CMC y el esparcido de atrayentes las incrementan. Los camarones con origen de Veracruz presentaron una mejor Suv que aquellos con origen de Sinaloa empleados en los experimentos previos. A pesar de la deficiencia teórica de la dieta de base, esta dieta fue capaz de soportar una Suv de buena a moderada en los camarones durante 28 días . Después de 15 minutos de inmersión en el agua, las diferencias en el contenido de Met entre los alimentos experimentales se ha perdido, debido a la lixiviación de la DL-Met encapsulada en CMC. La suplementación de 0.3% de DL-Met encapsulada en CMC para exceder ligeramente (4%) el contenido de Met en carcas de camarón no mejoró la Suv o el crecimiento obtenido con una fórmula 44% deficiente en Met. El parámetro de Suv supone que es más eficiente la utilización Met encapsulada en agar que la del AA libre o encapsulado en CMC, a pesar de que a los 15 minutos de inmersión ya se han lixiviado en su totalidad los diferentes tipos de Met suplementada. Según lo anterior resulta prioritario desarrollar AA puros estables en las dietas y asimilables para el camarón. El uso de un atrayente esparcido sobre el pelet terminado lejos de mejorar el consumo y esto repercutir en el crecimiento, disminuyó la estabilidad del pelet.

8.10 Contribución relativa de nitrógeno dietario al carcas de *L. vannamei*

(Experimento 11)

Las dietas a base de proteína de chícharo y proteína de pescado reflejan el perfil de AA de las respectivas harinas. La dieta harina de chícharo verde 3 fue 61% deficiente en Met (con 0.18% de Met cruda y 0.17% de Met digestible) y 8% en Thr (con 0.72% de Thr cruda y 0.64% del Thr digestible) con respecto al carcas de camarón pero cubrió el resto de los AA mientras que la dieta harina de pescado fue 15% deficiente en Arg (con 1.32% de Thr cruda y 1.29% del Thr digestible). La Suv de los camarones alimentados con la dieta a base de proteína de chícharo fue buena, aún con una deficiencia teórica del 61% en Met y su perfil biológico no sea adecuado para camarón. La deficiencia en Met de la dieta chícharo verde 3 se reflejó en un bajo crecimiento, en lugar de en una baja Suv seguramente debido al corto tiempo de experimentación y a una compensación parcial del requerimiento de Met por el consumo ocasionado por un régimen de alimentación a saciedad y en exceso. Por otra parte, una deficiencia teórica del 15% en Arg en la dieta proteína de pescado no afectó y permitió un crecimiento adecuado en el *L. vannamei*.

Los resultados isotópicos indican que las contribuciones del nitrógeno de las harinas de chícharo y de pescado son muy parecidas a los niveles dietarios. Los crecimientos sugieren que la sustitución de 40% de nitrógeno procedente del chícharo por nitrógeno del pescado promueve un crecimiento y una tasa de Suv semejantes a ser alimentados únicamente con nitrógeno de pescado. El uso de bajos niveles de proteína dietaria, proporciona un marco diferente para evaluar, la contribución dietaria de nitrógeno de origen vegetal frente al de origen animal para crecimiento de los camarones. Las dietas formuladas con derivados de chícharo con altos contenidos de proteína de chícharo y mezclados con fuentes complementarias de proteína podrían soportar buen crecimiento en camarones con estadios tempranos de vida. Los estudios a partir de los análisis de isótopos estables de compuestos específicos, podría ayudar a dilucidar la transferencia de nutrientes indispensables como los AA de los ingredientes dietarios hacia los tejidos del camarón en un futuro.

8.11 Conclusiones Globales

La deficiencia de 20 % de Met en la dieta deficiente soya 1 tipo comercial con un contenido teórico de 0.58% de Met cruda y 0.56% de Met digestible no afecta el rendimiento del camarón; por lo tanto, los niveles de Met recomendados por Akiyama *et al.* (1991) para la formulación de dietas para *L. vannamei* están sobreestimados y podría ser más conveniente utilizar como una primera aproximación el perfil de AA del carcas de determinado en esta tesis (2.07% Met, 0.98% Cys, 3.04% AAS, 6.64% Lys, 3.59% Thr, 6.98% Arg, 3.77% Ile, 6.55% Leu, 4.37% Val, 2.28 His, 4.29% Phe, en % de la PC) en el estudios del contenido de AA dietarios.

La dieta deficiente soya 1 aparentemente el nivel de Met digestible no fue el primer AA limitante, posiblemente debido al relevante aporte de Cys digestible de los ingredientes y de colina como importantes ahorradores de Met para funciones diferentes a la síntesis de proteínas.

Las dietas presentan la PAA más importante dentro de los primeros 15 minutos de inmersión. A pesar de estar formuladas a base de proteínas vegetales íntegras presentan una fracción importante de AA que la componen (de entre 8 y 25%) que es soluble. Las PAA más importantes son las de Met (20%), Lys (25%) y Arg (20%); el impacto de la lixiviación de estos en la reducción del valor nutricional de la dieta es elevado (90%) con respecto al impacto de la digestibilidad de los ingredientes (10%). Los productos evaluados como fuente de Met (MHA, DL Met y DL-Met encapsulada en agar o CMC) presentan altas tasas de lixiviación, lo que no permite determinar los efectos de su adición en dietas deficientes sobre el rendimiento del camarón, por lo que resulta imperante desarrollar fuentes de Met estables en el agua marina y asimilables por el camarón. El proceso de post-acondicionamiento no redujo la PAA libres suplementados en la dieta.

Las dietas experimentales a base de soya y trigo o a base de soya, trigo y chícharo con contenidos de 0.37-0.43% de Met, 0.42-0.53% Cys y 0.79-0.96 AAS (contenidos digestibles de 0.35-0.42% de Met, 0.37-0.48% Cys y 0.71-0.90% AAS o digestibles y

corregidos por lixiviación de 0.28-0.33% de Met, 0.32-0.41% Cys y 0.67-0.74 AAS) producen una baja Suv y canibalismo a causa de la deficiencia en Met. Las dietas deficientes en Met a base de chícharo y pescado con contenidos de 0.17-0.38% de Met, 0.26-0.28% Cys y 0.46-0.58 AAS (contenidos digestibles de 0.17-0.30% de Met, 0.24-0.26% Cys y 0.43-0.54% AAS) presentan un bajo crecimiento como signo de la deficiencia en Met y AAS en 28 días de consumo y con alimentación a saciedad.

El signo más extremo de una deficiencia de Met en los alimentos soya⁴ y chícharo 1 y 2 se manifestó con baja Suv y canibalismo, que va seguido de bajos rendimientos en los parámetros de crecimiento en el camarón.

Se recomienda que el diseño de los experimentos dosis-respuesta con Met considerar un tiempo mínimo de experimentación de 42 días para agotar las reservas del AA y expresar los efectos del contenido nutricional de las dietas sobre los parámetros zootécnicos; que se use un alimento comercial nutricionalmente completo de control externo; que se considere el contenido de AA digestibles y estables de las dietas y de compuestos ahorradores Met en la dieta y que se considere que se cuantifique la cantidad de Met consumida.

De las formulas evaluadas, la dieta a base de proteínas de chícharo y pescado con una combinación de 60:40, con una deficiencia exclusiva en Met parece la más adecuada desde el punto de vista de estabilidad en el agua para intentar determinar el requerimiento de Met mediante el método dosis-respuesta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUDI, T., OOGHE, W., LARONDELLE, Y. & ROLLIN, X. 2007. Determination of the threonine requirement for maintenance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry with the diet dilution procedure. *Aquaculture Nutrition*, 13, 281-290.
- ADM 2006. ADM L-LYSINE HCl In: ARCHER DANIELS MIDLAND, C. (ed.). Decatur, Illinois 62526 USA: Archer Daniels Midland, Co.
- AKIYAMA, D. M., DOMINY, W. C. & LAWRENCE, A. L. 1991 Penaeid Shrimp Nutrition for the commercial Feed Industry. In: ASSOCIATION, A. S., ed. *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*, 7-10 de Noviembre de 1994 Singapore. American Soybean Association, 43-79.
- ALAM, M. S., TESHIMA, S.-I., YANIHARTO, D., ISHIKAWA, M. & KOSHIO, S. 2002. Dietary amino acid profiles and growth performance in juvenile kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133, 289-297.
- ALAM, M. S., TESHIMA, S., ISHIKAWA, M., HASEGAWA, D. & KOSHIO, S. 2004a. Dietary arginine requirement of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research*, 35, 842-849.
- ALAM, M. S., TESHIMA, S., KOSHIO, S. & ISHIKAWA, M. 2004b. Effects of supplementation of coated crystalline amino acids on growth performance and body composition of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture Nutrition*, 10, 309-316.
- ALAM, M. S., TESHIMA, S., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., UYAN, O., HERNANDEZ, L. H. H. & MICHAEL, F. R. 2005. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 248, 13-19.
- ALVAREZ, O. I. 2003. *Tasa de ingestión y conducta alimenticia de reproductores de L. vannamei: Efecto de atractantes/estimulantes alimenticios sintéticos en dietas*. MAGISTER EN CIENCIAS, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.
- AMAYA, E., DAVIS, D. A. & ROUSE, D. B. 2007a. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 262, 419-425.
- AMAYA, E. A., DAVIS, D. A. & ROUSE, D. B. 2007b. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*, 262, 393-401.
- AOAC INTERNATIONAL 1997. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC INTERNATIONAL 2006. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- BAUTISTA-TERUEL, M. N., EUSEBIO, P. S. & WELSH, T. P. 2003. Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 225, 121-131.
- BELTRÁN, M., FERNÁNDEZ-BORRÁS, J., MÉDALE, F., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., KAUSHIK, S. & BLASCO, J. 2009. Natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquaculture Nutrition*, 15, 9-18.

- BHATTY, R. S. & CHRISTISON, G. I. 1984. Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) meals, protein concentrates and isolates. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 34, 41-51.
- BICUDO, Á. J. A., SADO, R. Y. & CYRINO, J. E. P. 2009. Dietary lysine requirement of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture*, 297, 151-156.
- BISHNOI, S. & KHETARPAUL, N. 1994. Protein digestibility of vegetables and field peas (*Pisum sativum*). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 46, 71-76.
- BISWAS, P., PAL, A. K., SAHU, N. P., REDDY, A. K., PRUSTY, A. K. & MISRA, S. 2007. Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture*, 265, 253-260.
- BOGRACHEVA, T. 1998. Pea Starch and its Functional Properties in Food and non-Food Uses. *Grain Legumes*.
- BORTONE, D. E. 2002. Interacción de ingredientes y Procesos en la Producción de Alimentos Hidroestables para Camarones. In: CRUZ SUAREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., TAPIA SALAZAR, M., GAXIOLA, G. & SIMOES, N., eds. *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 3 al 6 de Septiembre del 2002 Cancún, Quintana Roo, México. Monterrey, Nuevo Leon, Mexico: Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 407-437.
- BORTONE, D. E. 2006. Tecnología de Alimentos Balanceados para Peces y Crustáceos. In: CRUZ SUAREZ, L. E., NIETO LOPEZ, M., TAPIA SALAZAR, M., RICQUE MARIE, D., GARCÍA FLORES, A. & NAVARRO GONZALEZ, H. A., eds. *Curso RAPCO en Acuicultura 2006*, 12-16 de Junio Monterrey, Nuevo León, México. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 1-16.
- BROWDY, C. L., BHARADWAJ, A. S., VENERO, J. A. & NUNES, A. J. P. 2011. Supplementation with 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (HMTBa) in low fish meal diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, Non published
- BUCHHEISTER, A. & LATOUR, R. J. 2010. Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of a migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67, 445-461.
- BUREAU, D. P. 2011. The challenge of defining and meeting the essential amino acid requirements of fish. *AQUA culture Asia Pacific Magazine*. Kuala Lumpur, Malaysia: Aqua Reseach Pte Ltd.
- BUREAU, D. P. & ENCARNACAO, P. 2006. Adequately Defining the Amino Acid Requirements of Fish: The Case Example of Lysine. In: CRUZ SUÁREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., TAPIA SALAZAR, M., NIETO LOPEZ, M., VILLAREAL CAVAZOS, D., PUELLO CRUZ, A. C. & GARCÍA ORTEGA, A., eds. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 15-17 Noviembre de 2006 Mazatlán, Sinaloa, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, 29-54.
- CAO, W., ZHANG, C., HONG, P., JI, H., HAO, J. & ZHANG, J. 2009. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 244-249.
- CASTELL, J. D. 1990. Reference diet for crustacean principles of experimentation. In: IFREMER (ed.) *Advances in Tropical Aquaculture. Actes des colloques*. Plouzane, France: IFREMER.
- CATACUTAN, M. R. 1991. Apparent digestibility of diets with various carbohydrate levels and the growth response of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 95, 89-96.
- CHEN, G., FENG, L., KUANG, S., LIU, Y., JIANG, J., HU, K., JIANG, W., LI, S., TANG, L. & ZHOU, X. 2011. Effect of dietary arginine on growth, intestinal enzyme activities and gene expression in

- muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *British Journal of Nutrition*.
- CHEN, H. Y., LEU, Y. T. & ROELANTS, I. 1992a. Effective supplementation of Arginine in the Diets of Juvenile Marine Shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 108, 87-95.
- CHEN, H. Y., LEU, Y. T. & ROELANTS, I. 1992b. Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*, using microencapsulated arginine. *Marine Biology*, 114, 229-233.
- COUSIN, M., CUZON, G., GUILLAUME, J. & AQUACOP 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. *Aquaculture*, 140, 361-372.
- COWEY, C. B. & CHO, C. Y. 1993. Nutritional requirements of fish. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52, 417-426.
- COWEY, C. B. & TACON, A. G. J. 1982. FISH NUTRITION - RELEVANCE TO INVERTEBRATES. In: PRUDER, G. D., LANGDON, C. & CONKLIN, D. *Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition* (ed.)^(eds.). World Aquaculture Society: Baton Rouge, Louisiana, 13-25.
- CRUZ-SUAREZ, L., RICQUE-MARIE, D. & RUIZ, D. P. P. 2006. Application of Protected Methionine Sources in Shrimp Nutrition. In: INDUSTRIA, R. A. L. (ed.). Sn. Nicolas Nuevo León: Maricultura, UANL.
- CRUZ-SUAREZ, L., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., MCCALLUM, I. & HICKLING, D. 2001. Assesment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*, 196, 87-104.
- CRUZ-SUAREZ, L. E., ANTIMO-PEREZ, J. S., N., L.-M., TAPIA-SALAZAR, M., GUAJARDO-BARBOSA, C. & RICQUE-MARIE, D. 2000 Relaciones proteína/energía y proteína vegetal/animal optimas en alimentos de engorda para *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. In: CRUZ SUÁREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., TAPIA SALAZAR, M., OLVERA NOVOA, M. A. & CIVERA CERECEDO, R., eds. *Avances en Nutrición Acuícola V. 2000. Memorias del Quinto Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos*, 19-22 Noviembre, 2000 Mérida Yucatán. Universidad Autónoma de Nuevo León, 1-22.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., PINAL-MANSILLA, J. D. & WESCHE-EBELLING, P. 1994. Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture*, 123, 349-360.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., MARÍN-ZALDIVAR, L. F., GUAJARDO-BARBOSA, C., NIETO-LÓPEZ, M. & SALINAS-MILLER, A. 2002 Historia y estatus actual de la digestibilidad y de algunas características fisicoquímicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., GAXIOLA-CORTÉS, M. G., SIMOES, N., ed. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3 al 6 de Septiembre del 2002 Cancún, Quintana Roo, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, 1-22.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E., RUIZ-DÍAZ, P. P., COTA-CERECER, E., NIETO-LÓPEZ, M., TAPIA-SALAZAR, M., GUAJARDO-BARBOSA, C., VILLARREAL-CAVAZOS, D. & RICQUE-MARIE, D. 2006 Revisión sobre algunas características físicas y de control de calidad de alimentos comerciales para camarón en México. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, NIETO-LÓPEZ, M., VILLARREAL-CAVAZOS, D., PUELLO CRUZ, A., C., GARCÍA-ORTEGA, A., ed. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. Memorias del VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 15 a 17 de Noviembre del 2006 Hermosillo, Sonora, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, 330-369.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E., TAPIA-SALAZAR, M., VILLARREAL-CAVAZOS, D., BELTRAN-ROCHA, J., NIETO-LÓPEZ, M. G., LEMME, A. & RICQUE-MARIE, D. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid

- digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 292, 87-94.
- CRUZ SUÁREZ, L. E. 2011. *RE: Costos de la formulación de alimentos para Litopenaeus vannamei, su impacto económico en el cultivo y avances en el estudio de nutrientes indispensables.*
- CRUZ SUÁREZ, L. E., RUIZ DÍAZ, P., VILLAREAL CAVAZOS, D., NIETO LOPEZ, M., RICQUE MARIE, D., LOCATELLI, L. & LEMME, A. 2005. Leaching impacts amino acid profiles of commercial shrimp feeds. *Global Aquaculture Advocate*. St. Louis, MO, USA Global Aquaculture Alliance.
- CUARON, J. A. 2000. Proteína ideal na alimentação de suínos aspectos práticos. *Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos Campinas* (ed.)^(eds.). Sau Pablo, 197-218.
- DAVIES, S. J. & GOUVEIA, A. 2010. Response of common carp fry fed diets containing a pea seed meal (*Pisum sativum*) subjected to different thermal processing methods. *Aquaculture*, In Press, Corrected Proof.
- DAVIS, D. A. & ARNOLD, C. R. 1993. Evaluation of five carbohydrate *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 114, 285-292.
- DAVIS, D. A. & ARNOLD, C. R. 1995. Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 133, 287-294.
- DAVIS, D. A. & ARNOLD, C. R. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 185, 291-298.
- DAVIS, D. A., ARNOLD, C. R. & MCCALLUM, I. 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 8, 87-94.
- DEGUSSA 1989. Catálogo producto DL-Metionina. . In: INDUSTRIE., D. A. G. (ed.) *Degussa*. Republica federal de Alemania: Degussa.
- DELONG, D. C., HALVER, J. E. & MERTZ, E. T. 1958. Nutrition of salmonid fishes. X. Quantitative theronine requirements of chinook salmon at two water temperatures. *Journal of Nutrition*, 65, 589-599.
- DESHIMARU, O.1981 Protein and amino acids nutrition of the prawn *Penaeus Japonicus*. In: PRUDER, G. D., LANGDON, C. J. & D., C., eds. *Biochemical an physiological approaches to shellfish nutrition Rehobot Beach, Delaware*. World Mariculture Society, 106-123.
- DESHIMARU, O. & KUROKI, K. 1974. Studies on a purified diet for prawn III. A feeding experiment with aminoacid test diets. . *Bulletin of japanese Society of Scientific Fisheries*, 41, 101-103.
- DEVRESSE, B.1998 Producción de Alimentos Para Camarón Estables en el Agua. In: CIVERA CERECEDO, R., C.J., P. E., RICQUE MARIE, D. & CRUZ SUÁREZ, L. E., eds. *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del Cuarto Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*,15-18 Noviembre La Paz, B.C.S., México. Universidad Autónoma de Nuevo León. , 526-539.
- DIBNER, J. J. 2003. Review of the metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid. *Worlds Poultry Science Journal*, 59, 99-110.
- DIBNER, J. J. & IVEY, F. J. 1991. Relationship of practical supplemental levels of methionine activity to chick liver enzyme conversion capacity. *Monsanto Company*.
- DIVAKARAN, S. 1994. An evaluation of polyamino acids as an improved amino acid source in marine shrimp (*Penaeus vannamei*) feeds. *Aquaculture*, 128, 300-306.
- DOMINY, W. G. & LIM, C.1991 Performance of binders in pelleted shrimp diets. In: AKIYAMA, D. M. & TAN, R. K. H., eds. *Proccedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*,September 14-25 Thailand and Indonesia. Singapore: American Soybean Association, 149-157.

- DONANGELO, C. M., PEDERSEN, B. & EGGUM, B. O. 1986. Protein, energy and mineral utilization in rats fed rice-legume diets. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 36, 119-137.
- DREW, M. D., BORGESON, T. L. & THIESSEN, D. L. 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Animal Feed Science and Technology*, 138, 118-136.
- EWING, W. N. 1998. *Feeds Directory: Commodity Products*, Heather Leicestershire, UK.
- FAO 2010. 2008/FAO anuario Estadísticas de pesca y acuicultura, FAO, Roma Italia.
- FOGLE, B. A., MCCULLOUGH, P. R. & VAZQUEZ-AÑÓN, M. 1999. Alimet and dl methionine solubility in extruded aquatic feeds. *International Aquafeed Magazine*. Uxbridge, UK: West Andrew.
- FONDAGRO 2006. La lecitina de soya. FONDAGRO.
- FONTAINE, J. 2003. Amino acid analysis of feeds. In: D'MELLO, J. P. F. *Amino Acids in Animal Nutrition* (ed.) (eds.). Cabi Publishing: Wallingford, UK, 15-40.
- FORSTER, I. P., DOMINY, W. & TACON, A. G. J. 2002 The use of concentrates and other soy products in shrimp feeds. In: CRUZ SUAREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., TAPIA SALAZAR, M., GAXIOLA, G. & SIMOES, N., eds. *Avances en nutricion acuicola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutricion Acuicola*, 3 al 6 de Septiembre del 2002 Cancún, Quintana Roo, México. Monterrey, Nuevo Leon, Mexico: Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 527-540.
- FORSTER, I. P. & DOMINY, W. G. 2006. Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37, 474-480.
- FOX, C. J., BLOW, P., BROWN, J. H. & WATSON, I. 1994. The effect of various processing methods on the physical and biochemical properties of shrimp head meals and their utilization by juvenile *Penaeus monodon* Fab, Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- FOX, J., DAVIS, D. A. & LAWRENCE, A. L. 2007. Methionine- Sulfur-Containing Amino Acids: Limiting Nutrients In Commercial Formulations? *Global Aquaculture Advocate*. St Louis, MO, USA: Global Aquaculture Alliance.
- FOX, J., DAVIS, D. A., WILSON, M. & LAWRENCE, A. L. 2006 Current status of amino acid requirements research with marine penaeid shrimp *Avances en nutricion acuicola VIII. Memorias del VIII Simposio Internacional de Nutricion Acuicola*. In: CRUZ SUAREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., NIETO LOPEZ, M., TAPIA SALAZAR, M., VILLAREAL, D., PUELLO CRUZ, A. C. & GARCIA ORTEGA, A., eds. *Avances en nutricion acuicola VIII. Memorias del VIII Simposio Internacional de Nutricion Acuicola*, 15 al 17 de noviembre de 2006 Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Monterrey, Nuevo Leon, Mexico: Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 182-195.
- FOX, J. M., LAWRENCE, A. L. & LI-CHAN, E. 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture*, 131, 279-290.
- FOX, J. M., LAWRENCE, A. L., PATNAIK, S., FORSTER, I., YONG, J. Z. & DOMINY, W. 2010 Estimation of feed level of methionine by *Litopenaeus vannamei* (Boone) using covalently-attached and crystalline sources in low-protein semi-purified diets. In: CRUZ-SUAREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., NIETO-LÓPEZ, M. G., VILLARREAL-CAVAZOS, D. A. & GAMBOA-DELGADO, J., eds. *Avances en Nutrición Acuicola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuicola San Nicolás de los Garza, N. L., México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- FRY, B. (ed.) 2006. *Stable Isotope Ecology*: Springer.
- FRY, B. & ARNOLD, C. 1982. Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia*, 54, 200-204.

- GALGANI, F., CECCALDI, H. J. & AQUACOP 1988. Efect de l'incorporation de farines de soja et de poisson dans l'aliment sur la croissance et les enzymes digestives de *Penaeus vannamei*. *Aquatic Living Resources*, 1, 181-187.
- GAMBOA-DELGADO, J. & LE VAY, L. 2009a. Artemia replacement in co-feeding regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon stable isotopes. *Aquaculture*, 297, 128-135.
- GAMBOA-DELGADO, J. & LE VAY, L. 2009b. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture*, 291, 115-123.
- GANNES, L. Z., O'BRIEN, D. M. & DEL RIO, C. M. 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats and a call for more laboratory experiments *Ecology*, 78, 1271-1276.
- GOMEZ-JIMENEZ, S., URIAS-REYES, A. A., VAZQUEZ-ORTIZ, F. & HERNANDEZ-WATANABE, G. 2004. Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture*, 233, 573-581.
- GUERRERO, M. Noviembre 2010 2009. RE: *Actividad de la fitasa del chícharo forrajero*.
- GUILLAUME, J. 1997. Protein and Amino Acids. In: LOUIS R. D'ABRAMO, D. E. C., AND DEAN M. AKIYAMA *Crustacean Nutrition* (ed.)^(eds.). World Aquaculture Society: Baton Rouge, Louisiana, USA, 587.
- GURKIN, S. O. & ORTHOEFER, F. 1993 La lecitina en acuicultura (Lecithin in aquaculture). In: CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D. & MENDOZA ALFARO, R., eds. *Avances en Nutrición Acuicola III. Memorias del Primer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos. San Nicolas de los Garza, Nuevo León, México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, 329-344.
- HALVER, J. E., DELONG, D. C. & MERTZ, E. T. 1957. Nutrition of salmonid fishes. V. clasiffication of eesential amino acids for chinook salmon. *Journal of Nutrition*, 63, 95-105.
- HARDY, R. W. 2006 Worlwide Fish Meal Production Outlook and the Use of Alternative Protein Meals for Aquaculture. In: CRUZ SUAREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., NIETO LOPEZ, M., TAPIA SALAZAR, M., VILLAREAL, D., PUELLO CRUZ, A. C. & GARCIA ORTEGA, A., eds. *Avances en nutricion acuicola VIII. Memorias del VIII Simposio Internacional de Nutricion Acuicola*, 15 al 17 de noviembre de 2006 Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Monterrey, Nuevo Leon, Mexico: Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 410-419.
- HERNANDEZ. 2010. RE: *Encapsulamiento de aminoácidos mediante la técnica japonesa*.
- HERTRAMPF, J. W. & PIEDAD-PASCUAL, F. 2003. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds, Kluwer Academic Pub
- HESS, V., FICKLER, J., FONTAINE, J. & HEIMBECK, W. 2006. AminoDat® 3.0 — amino acid composition of feedstuffs. Evonik-Degussa GmbH, Health and Nutrition, Hanau, Germany.
- HESSLEIN, R. H., HALLARD, K. A. & RAMLAL, P. 1993. Replacement of Sulfur, Carbon, and Nitrogen in Tissue of Growing Broad Whitefish (*Coregonus nasus*) in Response to a Change in Diet Traced by $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 2071–2076
- HICKLING, D. 2003. Canadian Feed Peas Industry Guide., Pulse Canada, Winnipeg, Manitoba, 1-36.
- HOBSON, K. A. & CLARK, R. G. 1992. Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes I: Turnover of ^{13}C in Tissues. *The Condor*, 94, 181-188
- HUAI, M.-Y., LIU, Y.-J., TIAN, L.-X., DENG, S.-X., XU, A.-L., GAO, W. & YANG, H.-J. 2009a. Effect of dietary protein reduction with synthetic amino acids supplementation on growth performance, digestibility, and body composition of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*.

- HUAI, M.-Y., TIAN, L.-X., LIU, Y.-J., XU, A.-L., LIANG, G.-Y. & YANG, H.-J. 2009b. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquaculture Research*, 40, 904-914.
- KOSHIO, S., KANAZAWA, A., TESHIMA, S.-I. & CASTELL, J. D. 1989. Nutritional Evaluation of Crab Protein for Larval *Penaeus japonicus* fed Microparticulate Diets. *Aquaculture*, 81, 145-154.
- KUMARAGURU VASAGAM, K. P. & RAJKUMAR, M. 2011. Beneficial influences of germination and subsequent autoclaving of grain legumes on proximate composition, antinutritional factors and apparent digestibility in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture Nutrition*, 17, e188-e195.
- KURESHY, N. & DAVIS, D. A. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204, 125-143.
- LANDA-HABANA, L., PIÑA-HERNÁNDEZ, A., AGAMA-ACEVEDO, E., TOVER, J. & BELLO-PÉREZ, L. A. 2004. Effect of Cooking Procedures and Storage on Starch Bioavailability in Common Beans (*Phaseolus vulgaris*; L.). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 59, 133-136.
- LE VAY, L. & GAMBOA-DELGADO, J. 2010. Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture*, In Press, Corrected Proof.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. & COX, M. M. 1995. *Principios de bioquímica*, Ediciones Omega, Barcelona, España, 111-160.
- LIEBERT, F. 2009. Amino acid requirement studies in *Oreochromis niloticus* by application of principles of the diet dilution technique. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93, 787-793.
- LIEBERT, F. & BENKENDORFF, K. 2007. Modelling of threonine and methionine requirements of *Oreochromis niloticus* due to principles of the diet dilution technique. *Aquaculture Nutrition*, 13, 397-406.
- LIM, C. 1993. Effect of dietary pH on amino acid utilization by shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 114.
- LLAMES, C. & FONTAINE, J. 1994. Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *JAOAC Int.*, 77, 1362-1402.
- LOVELL, R. T. 1991. Nutrition of Aquaculture Species *J. Anim. Sci.*, 69, 4193-4200.
- MARTÍNEZ DEL RIO, C. & WOLF, B. O. 2005. Mass-balance models for animal isotopic ecology. *In: STARCK, J. M. & WANGT. Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates* (ed.)^(eds.). Science Publishers: Enfield, NH, 141-174.
- MCINTOSH, R. 2010. El verdadero costo del camarón tailandés. *Industria Acuícola*. Sinaloa, México: Industria acuícola.
- MCMAHON, K. W., FOGEL, M. L., ELSDON, T. S. & THORROLD, S. R. 2010. Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein. *Journal of Animal Ecology*, 79, 1132-1141.
- MENTE, E. 2003. *Nutrition, Physiology and Metabolism of Crustaceans*, Science Publisher, Inc., N.H., U.S.A., 156.
- MENTE, E., COUTTEAU, P., HOULIHAN, D., DAVIDSON, I. & SORGELOOS, P. 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology*, 205, 3107-3122.
- MICHAEL, F. R., KOSHIO, S., TESHIMA, S., ISHIKAWA, M. & UYAN, O. 2006. Effect of choline and methionine as methyl group donors on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 258, 521-528.

- MILLAMENA, O. M., BAUTISTA-TERUEL, M. N. & KANAZAWA, A. 1996a. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 143, 403-410.
- MILLAMENA, O. M., BAUTISTA-TERUEL, M. N. & KANAZAWA, A. 1996b. Valine requirement of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius. *Aquaculture Nutrition*, 2, 129-132.
- MILLAMENA, O. M., BAUTISTA-TERUEL, M. N., REYES, O. S. & KANAZAWA, A. 1998. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. *Aquaculture*, 164, 95-104.
- MILLAMENA, O. M., BAUTISTA, M. N., REYES, O. S. & KANAZAWA, A. 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 151, 9-14.
- MILLAMENA, O. M., TERUEL, M. B., KANAZAWA, A. & TESHIMA, S. 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture*, 179, 169-179.
- MILLWARD, D. J., GARLICK, P. J., STEWART, R. J., NNANYELUGO, D. O. & WATERLOW, J. C. 1975. Skeletal-muscle growth and protein turnover. *Biochemical Journal* 150, 235-243.
- MOLINA-POVEDA, C. & MORALES, M. E. 2004. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 35, 1158-1165.
- MUÑOZ, L. O. 2004 Comparación entre Extruído y Pelletizado en alimentos de Camarones. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., NIETO-LÓPEZ, M.G., VILLAREAL, D., SCHOLZ, U. Y GONZÁLEZ, M. , ed. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*, 16-19 de Noviembre del 2004 *Hermosillo, Sonora, México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, 397-417.
- MUÑOZ, L. O. 2006 Comparación entre Extruído y Pelletizado en Alimentos de Camarones. In: CRUZ SUAREZ, L. E., NIETO LOPEZ, M., TAPIA SALAZAR, M., RICQUE MARIE, D., GARCÍA FLORES, A. & NAVARRO GONZALEZ, H. A., eds. *Curso RAPCO en Acuicultura 2006*, 12-16 de Junio *Monterrey, Nuevo León, México*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 1-16.
- NIETO-LÓPEZ, M., TAPIA-SALAZAR, M., RICQUE-MARIE, D., VILLARREAL-CAVAZOS, D., LEMME, A. & CRUZ-SUÁREZ, L. E. 2011. Digestibility of different wheat products in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 319, 369-376.
- NOSE, T. & MURAI, T. 1990. Amino acid requirements in fishes. In: YOSHIDA, A., NAITO, H., NIIYAMA, Y. & SUZUKI, T. *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (ed.)^(eds.). Heenemann, Berlin, 145-146.
- NOVUS INTERNATIONAL INC. 2005. MATERIAL SAFETY DATA SHEET: MHA METHIONINE HYDROXY ANALOG, CALCIUM. In: NOVUS INTERNATIONAL, I. (ed.) *NOVUS INTERNATIONAL, INC.* St. Louis Missouri, USA.
- NOVUS INTERNATIONAL INC. 2006. MHA Feed Supplement. In: NOVUS INTERNATIONAL, I. (ed.). D.F. MEXICO: NOVUS INTERNATIONAL, INC.
- NUNES, A. J. P., CARMO, M. V. D. & SABRY, N. H. 2010 Meeting the challenge of no fishmeal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*: case studies from Labomar, Brazil In: CRUZ-SUAREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., NIETO-LÓPEZ, M. G., VILLARREAL-CAVAZOS, D. A. & GAMBOA-DELGADO, J., eds. *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola San Nicolás de los Garza, N. L., México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 485-501.
- ONAL, U. & LANGDON, C. 2005. Development and characterization of complex particles for delivery of amino acids to early marine fish larvae. *Marine Biology*, 146, 1031-1038.
- PALANDER, S., LAURINEN, P., PERTTILÄ, S., VALAJA, J. & PARTANEN, K. 2006. Protein and amino acid digestibility and metabolizable energy value of pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and lupin (*Lupinus angustifolius*) seeds for turkeys of different age. 127, 89-100.

- PALMA, J., BUREAU, D. P., CORREIRA, M. & P, A. J. 2006 Quantitative dietary requirement of juvenile grass shrimp *Palaemonetes varians* (LEACH) for lysine, methionine and arginine. In: INRA, I. N. D. L. R. A., ed. *XII INTERNATIONAL SYMPOSIUM FISH NUTRITION & FEEDING: Program and Abstracts*, May 28 - June 1, 2006 Biarritz, France. INRA, 232.
- PARIPATANANONT, T., BOONYARATPALIN, M., PENGSENG, P. & CHOTIPUNTU, P. 2002. Substitution of soy protein concentrate for fishmeal in diets of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 32, 369-374.
- PEARSON, S. F., LEVEY, D. J., GREENBERG, C. H. & MARTÍNEZ DEL RIO, C. 2003. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia*, 135, 516-523.
- PEÑAFLORES, V. D. 1989. An evaluation of indigenous protein sources as potential component in the diet formulation for tiger prawn, *Penaeus monodon*, using essential amino acid index (EAAI). *Aquaculture*, 83, 319-330.
- PHILLIPS, D. L. & GREGG, J. W. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127, 171-179.
- RAO, M. A. 2007. Rheology of Food Gum and Starch Dispersions. *Rheology of Fluid and Semisolid Foods* (ed.)^(eds.). Springer US, 153-222.
- RICHARD, L., BLANC, P.-P., RIGOLET, V., KAUSHIK, S. J. & GEURDEN, I. 2009. Maintenance and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilisation efficiencies in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach.
- RICHARD, L., VACHOT, C., BRÈQUE, J., BLANC, P.-P., RIGOLET, V., KAUSHIK, S. & GEURDEN, I. 2010. The effect of protein and methionine intake on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase activities in juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 39, 153-160.
- RICHARD, L., VACHOT, C., SURGET, A., RIGOLET, V., KAUSHIK, S. & GEURDEN, I. 2011. The effect of choline and cystine on the utilisation of methionine for protein accretion, remethylation and trans-sulfuration in juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *British Journal of Nutrition*, 106, 825-835.
- RICQUE-MARIE, D., PEÑA-RODRIGUEZ, A., TAPIA-ZALAZAR, M., NIETO-LOPEZ, M., VILLAREAL-CAVAZOS, D., GUJARDO-BARBOSA, C., CRUZ-SUAREZ, L. & LOCATELLI, M. L. 2006. Effect of pre-prandial nutrient leaching in sea water and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei*, shrimp juveniles. *International aqua feed*. GL, UK.: Perendal Publishers.
- ROBBINS, C., FELICETTI, L. & SPONHEIMER, M. 2005. The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia*, 144, 534-540.
- ROTH, J. D. & HOBSON, K. A. 2000. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology*, 78, 848-852.
- RUIZ-RODRIGUEZ, A., MARÍN, F., OCAÑA, A. & SOLER-RIVAS, C. 2008. Effect of domestic processing on bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews*, 7, 345-384.
- RUIZ, B., SWICK, R., ATWELL, C. A. & DIBNER, J. J. 1994 Utilización del ácido 2-Hidroxi-4-Metiltio-Butanoico (HMB) y su conversión en L-metionina en c la alimentacion de camarones. In: MENDOZA, R., CRUZ SUAREZ, L. E. & RICQUE-MARIE, D., eds. *Avances en Nutrición Acuicola II. Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura Monterrey, Nuevo León, México*. Universidad Autónoma de Nuevo León, 235-242.
- SAGARPA 2009. Aporta acuicultura 130 mil toneladas (66%) de camarón entero a la producción nacional In: SAGARPA (ed.). Mexico D.F., Mexico: SAGARPA.

- SANTIAGO, C. B. & LOVELL, R. T. 1988. Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *J. Nutr.*, 118, 1540-1546.
- SHEARER, K. D. 1995. The use of factorial modeling to determine the dietary requirements for essential elements in fishes. *Aquaculture*, 133, 57-72.
- SMITH, D. M., ALLAN, G. L., WILLIAMS, K. C. & BARLOW, C. G. 2000. Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia. *In: CRUZ-SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., OLVERA-NOVOA, M.A. Y CIVERA-CERECEDO, R., ed. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 19-22 Noviembre Mérida, Yucatán, México.* Universidad Autónoma de Nuevo León, 277-286.
- SMITH, D. M., TABRETT, S. J., GLENCROSS, B. D., IRVIN, S. J. & BARCLAY, M. C. 2007. Digestibility of lupin kernel meals in feeds for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 264, 353-362.
- SRIKET, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. & KIJROONGROJANA, K. 2007. Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats, Elsevier, Oxford, ROYAUME-UNI.
- STENROTH, P., HOLMQVIST, N., NYSTROM, P., BERGLUND, O., LARSSON, P. & GRANELL, W. 2006. Stable isotopes as an indicator of diet in omnivorous crayfish (*Pacifastacus leniusculus*): the influence of tissue, sample treatment, and season. *. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67, 821–831
- STERLING, K., PESTI, G. & BAKALLI, R. 2003. Performance of broiler chicks fed various levels of dietary lysine and crude protein. *Poult Sci*, 82, 1939-1947.
- SWICK, R. A., AKIYAMA, D. M., BOONYARATPALIN, M. & CRESWELL, D. C. 1995. Use of soybean meal and synthetic methionine in shrimp feed. *In: ASSOCIATION, A. S. (ed.) Aquaculture.* Singapore: American Soybean Association.
- TACON, A. G. J. 1987a. THE NUTRITION AND FEEDING OF FARMED FISH AND SHRIMP - A TRAINING MANUAL 1. THE ESSENTIAL NUTRIENTS. *In: NATIONS, F. A. A. O. O. T. U. (ed.).* Brasilia, Brazil: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
- TACON, A. G. J. 1987b. THE NUTRITION AND FEEDING OF FARMED FISH AND SHRIMP - A TRAINING MANUAL 2. NUTRIENT SOURCES AND COMPOSITION. *In: NATIONS, F. A. A. O. O. T. U. (ed.).* Brasilia, Brazil: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
- TACON, A. G. J. 1989. NUTRICION Y ALIMENTACION DE PECES Y CAMARONES CULTIVADOS MANUAL DE CAPACITACION. *In: ZENDEJAS, HERNÁNDEZ, J., MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A., CHÁVEZ, M. A. & M.A., O. (eds.) Cuarto Curso de Entrenamiento a los acuaculturistas en Pirassununga, Brasil, del 23 de junio al 9 de julio de 1986.* Brasilia, Brasil: ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION.
- TACON, A. G. J., CODY, J. J., CONQUEST, L. D., DIVAKARAN, S., FORSTER, I. P. & DECAMP, O. E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8, 121-137.
- TACON, A. G. J. & METIAN, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285, 146-158.
- TESHIMA, S.-I., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M. & KANAZAWA, A. 2001. Protein requirement of the prawn *Marsupenaeus japonicus* estimated by a factorial method. *Hydrobiologia*, 449, 293-300.
- TESHIMA, S., ALAM, M. S., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M. & KANAZAWA, A. 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research*, 33, 395-402.

- THIESSEN, D. L., CAMPBELL, G. L. & ADELIZI, P. D. 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition*, 9, 67-75.
- TREVIÑO, C. L. M. & CELIS, G. A. 1999. Uso de la soya en Acuicultura. In: ROBERTO, M. A., ELIZABETH, C. S. L. & RICQUE MARIE, D., eds. *Avances en nutrición acuícola II*, 7-10 de Noviembre Monterrey, Nuevo León, Mexico. Universidad Autónoma de Nuevo León, 171-258.
- TWIBELL, R. G., GRIFFIN, M. E., MARTIN, B., PRICE, J. & BROWN, P. B. 2003. Predicting dietary essential amino acid requirements for hybrid striped bass. *Aquaculture Nutrition*, 9, 373-381.
- VALENCIA, D. G., SERRANO, M. P., CENTENO, C., LÁZARO, R. & MATEOS, G. G. 2008. Pea protein as a substitute of soya bean protein in diets for young pigs: Effects on productivity and digestive traits. 118, 1-10.
- VAZQUEZ-AÑON, M. & GIESEN, A. F. 2004. The use of methionine hydroxy analog in aquaculture feeds. In: CRUZ SUAREZ, L. E., RICQUE MARIE, D., NIETO LOPEZ, M., VILLAREAL CAVAZOS, D., SCHOLTZ, U., GONZALES FELIX, M. L. & M., P.-V., eds. *Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuicola* 14 al 18 de noviembre de 2004 Hermosillo, Sonora, Mexico. Monterrey, Nuevo Leon, Mexico: Universidad Autónoma de Nuevo Leon, 1-9.
- VAZQUEZ-AÑON, M., KRATZER, D., GONZALEZ-ESQUERRA, R., YI, I. G. & KNIGHT, C. D. 2006. A Multiple Regression Model Approach to Contrast the Performance of 2-Hydroxy-4-Methylthio Butanoic Acid and DL-Methionine Supplementation Tested in Broiler Experiments and Reported in the Literature. *Poultry Science, Inc.*, 85, 693-705.
- VELASCO, M., LAWRENCE, A., CASTILLE, F. L. & OBALDO, L. G. 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. In: CRUZ -SUÁREZ, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., OLVERA-NOVOA, M. A. & CIVERA-CERECEDO, R., eds. *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 19-22 Noviembre, 2000 Mérida, Yucatán, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, 181-192.
- VELASQUEZ, A., THOMPSON, K. R., CUMMINS, V. C. & WEBSTER, C. D. 2011. Methionine Requirement for Juvenile White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. In: *Aquaculture America 2011 New Orleans, Louisiana, USA*. WAS, 241.
- VILLAREAL CAVAZOS, D. 2011. *Determinación de la digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes utilizados en alimentos comerciales para caamrón blanco (Litopenaeus vannamei) en México*. Doctorado en ciencias biológicas, Universidad autónoma de Nuevo León.
- WANG, C. Z., SHI, Y. H., YANG, Y. X., LI, Z. T., GUO, Y. X. & JIANG, Y. B. 2006. Digestible methionine and lysine requirements, ratio and interactions in Lohmann egg-type cockerels. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30, 417-424.
- WATERLOW, J. C. 2006. Protein Turnover, CAB International, Oxfordshire, UK
- WILSON, R. P. 2003. Amino Acids Requirements of Finfish and Crustaceans In: D'MELLO, J. P. F. *Amino Acids in Animal Nutrition* (ed.)^(eds.). Cabi Publishing: Wallingford, UK, 427-448.
- WILSON, R. P. & COWEY, C. B. 1985. Amino Acid Composition of Whole Body Tissue of Rainbow Trout and Atlantic Salmon
- WILSON, R. P. & HALVER, J. E. 1986. Protein and Amino Acid Requirements of Fishes. *Annual Review of Nutrition*, 6, 225-244.
- WILSON, R. P. & POE, W. E. 1985a. Relationship of whole body and egg essential amino acid utilization and the lysine requirement of fingerling channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80, 385-388.

- WILSON, R. P. & POE, W. E. 1985b. Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 80, 385-388.
- YADAV, B., SHARMA, A. & YADAV, R. 2010. Resistant starch content of conventionally boiled and pressure-cooked cereals, legumes and tubers. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 84-88.
- YEMANE, A. & SKJELVÅG, A. O. 2003. Physicochemical Traits of Dekoko (*Pisum sativum* var. abyssinicum) Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 58, 275-283.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Nombre: Luis Martínez Rocha

Dirección actual: Malvinas 588C, Colonia Vista Hermosa, Monterrey, Nuevo León, México

Dirección Permanente: Río Congo 14, Colonia Jardines de Morelos. Ecatepec, Estado de México, México

Padres: María de Lourdes Rocha Mejía
Luis Martínez Pérez

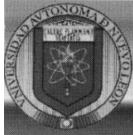
Lugar de nacimiento: México, D.F., el 26 de Enero de 1983

Educación: Universidad de las Américas – Puebla
San Andrés Cholula, Puebla
Licenciado en Biología, 2006

Colegio del Cobre
México, D. F.
Bachillerato con capacitación en Informática, 2001

Experiencia laboral:

2004-2005	Veterinaria Rubí
Cargo:	Asistente de médico veterinario
2002-2005	Universidad de las Américas-Puebla
Cargo:	Tutor Universitario.
2002-2003	Universidad de las Américas-Puebla
Cargo:	Asistente de Investigador.
2001-2002	Universidad de las Américas-Puebla
Cargo:	Asistente de Préstamo y adquisiciones en Biblioteca.
2000	Tornillos Alex de C.V.
Cargo:	Diseño y actualización de red informática
1998	Bristol-Mayers-Squibb
Cargo:	Capturista



EFFECTO DE LA ADICIÓN DE METIONINA Y LISINA A UN ALIMENTO A BASE DE SOYA-TRIGO SOBRE EL RENDIMIENTO DE CAMARÓN BLANCO *L. vannamei*



• Luis Martínez-Rocha, Martha Nieto-López, Mireya Tapia-Salazar, Denis Ricque-Marie, L. Elizabeth Cruz-Suárez

• Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd Universitaria. A.P. F-56, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México. Tel/fax (81) 83526380. E-mail: luismartinezra@gmail.com

Resumen

Se evaluó la adición de metionina (Met) y lisina (Lys) encapsuladas en agar en una fórmula deficiente (Met y Lys). En contraste con otros estudios de inclusión de fuentes de Met^{2,4} el crecimiento de los camarones no mejoró por la adición de Met. No obstante, la sobrevivencia mejoró significativamente (P=0.018) con respecto a la dieta control (80% vs 62%). Por otro lado, con el máximo nivel de inclusión de Lys (1.35%) se obtuvo una ganancia en peso significativamente mayor (P=0.04) con respecto al grupo alimentado con la dieta adicionada con Met sin suplemento de Lys. La adición de 1.35% de Lys también mejoró (P=0.036) la tasa de utilización de Met. Estos efectos atribuidos a la adición de Met y Lys se manifestaron a pesar de que el 96 y 94% de los AA adicionados se lixivió a los 15 min de inmersión.

Introducción

La pasta de soya y el trigo son los ingredientes vegetales más usados en alimentos para camarón, sin embargo su empleo es limitado por su deficiencia en Met y Lys¹. Con la finalidad de obtener mejores rendimientos en crustáceos, con dietas ricas en estos ingredientes, se ha propuesto la inclusión de AA sintéticos como DL-Met^{2,4} y HCl-Lys¹. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de adicionar Met (0.4%) así como la combinación de Met (0.4%) con 3 niveles de Lys (0.45, 0.9 y 1.35%) a un alimento a base de soya y trigo definido como deficiente en Met, según las recomendaciones de Akiyama³ y deficiente en Met y Lys según la composición de carcass de camarón¹.

Material y Método

Tabla 1. Dietas isoprotéicas (30%) utilizadas en el bioensayo, niveles de Met y Lys y sustitución de Agar por encapsulados de Lys y Met

Ingredientes (g/100 g)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5
Harina de trigo	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3
Pasta de soya	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Agar-Agar	4.5	3.7	2.5	1.4	0.2
Otros ingredientes	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3
Fuente de Met (DL-Met: agar)	-	0.8	0.8	0.8	0.8
Fuente de Lys (LysHCl: agar)	-	-	1.1	2.3	3.4
Met en el encapsulado de metionina	-	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys en el encapsulado de lisina	-	-	0.45	0.90	1.35
Met total en la dieta	0.50	0.91	0.91	0.91	0.91
Lys total en la dieta	1.96	2.01	2.45	3.00	3.37

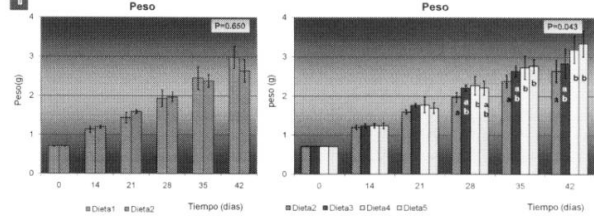
Tabla 2. Diseños del bioensayo de crecimiento y la prueba de lixiviación

Bioensayo de crecimiento		
	Evaluación de Met	Evaluación de Lys
Juveniles de camarón		0.7 g
No camarones	12	
Alimentación	Racionado al menor consumo (3 veces/día)	
Duración	42 días	
Tratamientos	Dieta1 (0.5%Met y 1.98%Lys)Vs complementada 0.4% DL-Met encapsulada	Dieta 2 Vs dietas 3,4 y 5; complementadas 0.4% DL-Met encapsulada y 0.0, 0.45, 0.9 y 1.35 Lys-HCl encapsulada
No replicados	4	
Parámetros zootécnicos evaluados	Ganancia en Peso, Tasa de crecimiento específico, Supervivencia, Biomasa, Consumo, Tasa de conversión alimenticia, Tasa de eficiencia proteica, Utilización proteína neta (UNP) y finalmente utilización neta de los aminoácidos Met y Lys (UNMet y UNLys)	
Análisis estadísticos	T-student (α=0.05%)	Anova + Duncan y contrastes ortogonales (α=0.05%)
Lixiviación		
Evaluación	Inmersión de las dietas (3g, 4 replicados) durante 15, 30 y 60 min (33g sal/L, 28°C)	
Parámetros	Pérdida de materia seca, de proteína y de aminoácidos (PMet y PLys)	

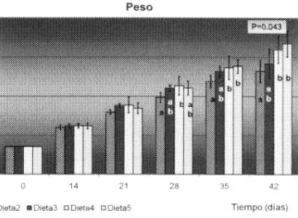
Conclusiones

La adición de Met y Lys en alimento a base de soya y trigo es necesaria para cubrir el requerimiento de estos AA definido en base a la composición del carcass del camarón. El tiempo de permanencia de estos AA encapsulados en agar y la estabilidad en el agua del alimento deben ser mejorados para definir niveles óptimos de suplementación.

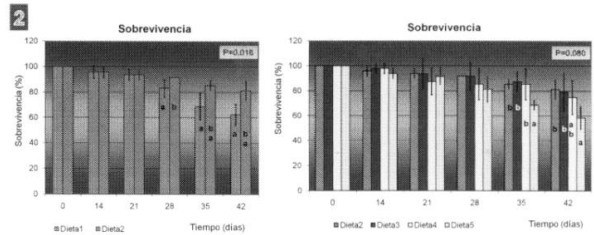
Resultados y Discusiones



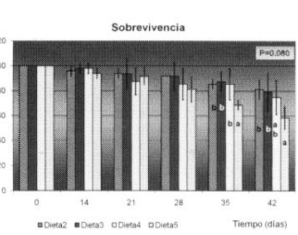
La adición de 0.4% de Met encapsulada en agar no promovió el crecimiento



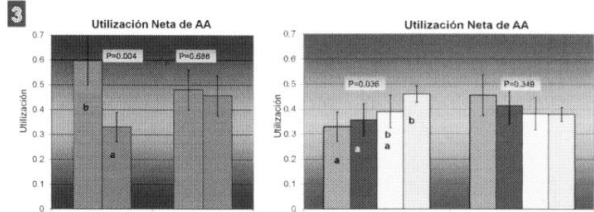
La adición de 0.45 a 1.35% de Lys encapsulada en agar promovió el crecimiento



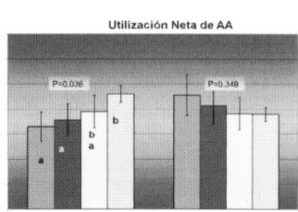
La adición de 0.4% de Met encapsulada en agar promovió la sobrevivencia



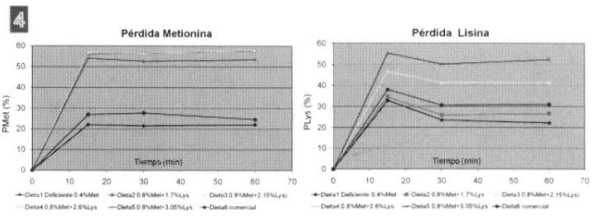
La adición de Lys encapsulada en agar disminuyó la sobrevivencia



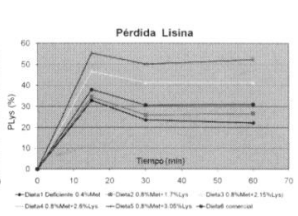
La adición de 0.4% de Met encapsulada en agar redujo la UNMet, pero no la UNLys



La adición de Lys encapsulada en agar incrementó la utilización de Met, pero no la de Lys



La lixiviación de metionina encapsulada en agar en promedio es del 96%

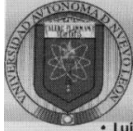


La lixiviación de lisina encapsulada en agar en promedio es del 94%

Las respuestas zootécnicas obtenidas con la adición de los aminoácidos encapsulados en agar concuerdan con estudios anteriores^{2,4}, donde han encontrado respuestas positivas en dietas deficientes adicionadas con aminoácidos libres, aún cuando se conoce de los altos niveles de lixiviación de estos.

Referencias

- Blawie, P., Pal, A.K., Sahu, N.P., Reddy, A.K., Prusty, A.K., Mishra, S. (2007). Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture*, 258: 253-260.
- Forster, J.P., Dosty, W.G. (2006). Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquacult Soc.* 37: 474-482.
- Akiyama, D.M., Dornoy, W.G., Lawrence, A.L. (1991). Penaeid Shrimp Nutrition for the commercial Feed Industry. revised. In Akiyama, D.M. & Tan (Ed.). *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*. ASA, Singapore, pp. 80-98.
- For, J., Davis, D.A., Lawrence, A.L. (2007). Methionine-Sulfur-Containing Amino Acids: Limiting Nutrients in Commercial Formulations? *Globel Aquaculture Advocate*, 10(2): 74-76.



EFFECTO DEL POST-ACONDICIONAMIENTO SOBRE LA HIDROESTABILIDAD Y LA DIGESTIBILIDAD DE UNA DIETA A BASE DE CHICHARO Y SOYA EN CAMARON L. vannamei

• Luis Martínez-Rocha, Mireya Tapia-Salazar, Susana Anaya, Alejandra Rivera, Junio Flores, Denis Ricque-Marie, L. Elizabeth Cruz-Suárez.
• Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd Universitaria A.P. F-56, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México. Tel/fax (81) 83526380. E-mail: luismartinezra@gmail.com.



Resumen

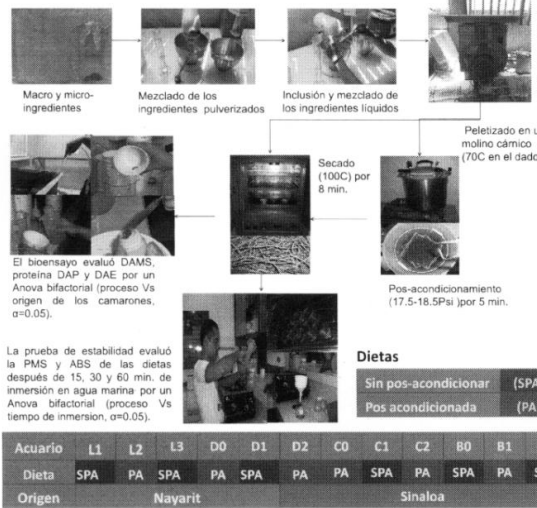
Se evaluó el efecto del pos-acondicionamiento sobre la hidroestabilidad y la digestibilidad de una dieta a base de chícharo, en juveniles de camarón de dos laboratorios distintos. La y la se incrementaron con el tiempo de inmersión. El pos-acondicionamiento redujo la pérdida de materia seca (PMS) ($P=0.002$) en promedio un 40% y la absorción de agua marina (ABS) ($P=0.005$) en un 50%. Las digestibilidades aparentes de materia seca (DAMS) (78%) y de energía (DAE) (85%) no cambiaron por el pos-acondicionamiento, pero la digestibilidad aparente de proteína (DAP) (92%) que disminuyó ligeramente (2 puntos) ($P=0.010$) sin importar el origen del camarón. La capacidad digestiva fue semejante en los camarones procedentes ambos laboratorios.

Introducción

Las principales propiedades que se consideran al producir un alimento para camarones además de su perfil nutricional son: estabilidad y digestibilidad. La introducción de ingredientes vegetales para sustituir proteínas marinas afecta estas propiedades de diferentes formas¹. A diferencia de la pasta de soya, el chícharo (*Pisum sativum*) es rico en almidón (46%). La gelatinización de estos almidones, por post-acondicionamiento o post-cocción puede mejorar su energía digestible y contribuir a mejorar la hidroestabilidad del alimento². El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del proceso de post-acondicionamiento sobre la hidroestabilidad y la digestibilidad de una dieta rica en chícharo y soya en dos orígenes de camarón.

Material y Método

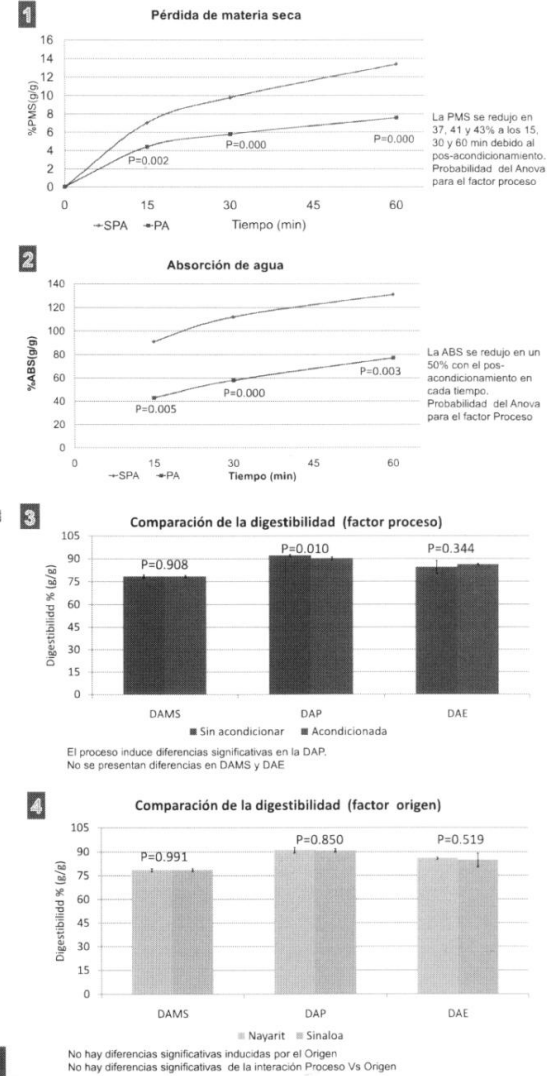
Se prepararon dos dietas (36 % chícharo, 32 % pasta de soya, 8% aislado de soya y 10% trigo isoproteicas (34%) e isoenergéticas (4.12 Kcal/g), extruidas en un molino de carne; una sin y otra con post-acondicionamiento. Se comparó la estabilidad (PMS y ABS) por medio de análisis de varianza de dos factores: proceso y tiempo de inmersión, de manera semejante se comparó la digestibilidad (DAMS, DAP y DAE) utilizando los factores proceso y origen del organismo.



Discusiones

El pos-acondicionamiento de la dieta mejoró la hidroestabilidad a niveles reportados para dietas comerciales^{1,2}. Los valores del presente estudio se asemejan a los obtenidos para DAMS (80%) y DAP (90%) en *L. stylosiris*, en trabajos donde comparan chícharo entero Vs extruido y muestran que la extrusión no modificó la digestibilidad². En contraste en *L. vannamei* observaron una mejora significativa en DAP (77.4-81.6) y DAE (73-77%) al extruir el chícharo³, pero con valores inferiores a los encontrados actualmente.

Resultados



Conclusiones

El pos-acondicionamiento de la dieta a base de chícharo y soya mejoró significativamente la hidroestabilidad de la dieta sin modificar la energía y la materia seca digestible. Los organismos de Nayarit y Sinaloa usados en el estudio presentaron la misma capacidad digestiva. Se recomienda la aplicación del proceso de post-acondicionamiento en la preparación de alimentos experimentales ricos en chícharo.

Referencias

- Cruz-Suárez, L.E., Ruiz-Díaz, P.P., Coja-Cerecer, E., Nieto-López, M., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Villarreal-Cavazos, D., Ricque-Marie, D., (2006). Revisión sobre algunas características físicas y de control de calidad de alimentos comerciales para camarón en México. in: Cruz-Suárez et al. (Ed.), SINA VIII. UANL, México, pp. 330-369.
- Cruz-Suárez, L., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I., Hickling, D. (2001). Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylosiris*). *Aquaculture*, 196, 87-104.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., (2002). Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult Nutr.* 8, 87-94.



INCORPORACIÓN DE NITRÓGENO DIETARIO DE LAS HARINAS DE CHÍCHARO Y DE PESCADO EN EL MÚSCULO DEL CAMARÓN BLANCO *L. vannamei*

• Luis Martínez-Rocha, Julián Gamboa-Delgado, Martha Nieto-López, Denis Ricque-Marie, L. Elizabeth Cruz-Suárez

• Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd Universitaria A.P. F-67, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México. Tel/fax (81) 83526380. E-mail: luismartinezra@gmail.com



Resumen

Se evaluó la contribución relativa de nitrógeno (N) dietario de las harinas de chícharo y pescado al carcas de *Litopenaeus vannamei*. A pesar de las diferencias en el perfil de aminoácidos (AA) aportado por las dos fuentes, la contribución de N de las harinas de chícharo y pescado al N en el carcas de camarón es semejante; lo cual contrasta con lo reportado para el aislado de soya. Sin embargo el pescado presentó los mejores resultados de crecimiento y únicamente la combinación de 40% de nitrógeno dietario del chícharo y 60% del pescado mostró resultados semejantes. Por otro lado, una sustitución de 30% de proteína de pescado (PP) mejoró el perfil de AA de la proteína de chícharo (PCh) incrementando el crecimiento en el camarón.

Introducción

El incremento en el costo y en la demanda de ingredientes marinos para la formulación de alimentos balanceados en acuicultura, ha conducido a la búsqueda de fuentes de proteína alterna. El chícharo forrajero (*Pisum sativum*) ha sido recomendado como ingrediente en la formulación de alimentos para camarón^{1,2} a pesar de su escaso contenido de Met en comparación con la soya en parte debido a sus altos coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (90%)¹, de proteína (90%) y energía (72%)² de este ingrediente. Por otra parte, el análisis de isótopos estables ha sido una herramienta ampliamente utilizada para trazar el flujo de nutrientes de un alimento hacia su consumidor³. El objetivo del presente estudio fue evaluar el grado de contribución relativa de N dietario de las harinas de chícharo y de pescado al crecimiento corporal de camarón blanco *L. vannamei* mediante el uso de isótopos estables.

Material y Método

Se formularon 2 dietas isoproteicas (22%) e isoenergéticas (4.7 Kcal/g), una con 100% de PCh y otra con 100% de PP; a partir de ellas se formularon 5 dietas intermedias sustituyendo 5, 15, 30, 45 y 60% de la dieta 100% PCh por la de 100% PP. Se analizó el perfil de AA por cromatografía líquida y el contenido relativo de isótopos estables del N de los ingredientes, las dietas y los camarones. Las dietas se evaluaron en juveniles de *L. vannamei* (0.14±0.08g) en un ensayo de crecimiento (29 días) con 3 replicados (15 camarones x tanque). Se determinó: la contribución de N dietario al mantenimiento (*m*) y al crecimiento (*k*), la contribución de materia seca y la vida media de N en el músculo (*t*_{1/2})³. Se aplicaron análisis de varianza de una vía ($\alpha=0.05$) para comparar *k*, regresiones no lineales iterativas para estimar el parámetro *m* y pruebas de bondad de ajuste de χ^2 para la comparación de contribuciones esperadas y observadas.

Tabla 1. Formulación de las dietas a base de chícharo y pescado.

Ingrediente (g/100g dieta)	95% PCh:		85% PCh:		70% PCh:		55% PCh:		40% PCh:	
	100% PCh	100% PP	15% PP	30% PP	30% PP	45% PP	60% PP	60% PP	100% PP	
Harina de pescado prime	—	1.62	4.85	9.69	14.6	19.3	32.3	—	—	—
Harina de chícharo entero	84.9	80.7	72.2	59.5	46.7	34.0	—	—	—	—
Almidón de trigo	—	2.25	6.74	13.5	20.2	27.0	43.0	—	—	—
α -celulosa	—	0.45	1.35	2.70	4.05	5.40	9.00	—	—	—
Aceite de pescado	4.77	4.76	4.75	4.72	4.70	4.67	4.60	—	—	—
Lecitina de soya	3.37	3.33	3.25	3.12	3.00	2.88	2.55	—	—	—
Ácido algínico	1.50	1.55	1.65	1.80	1.95	2.10	2.50	—	—	—
Fosfato monoalcalino	2.92	2.87	2.76	2.66	2.44	2.28	1.86	—	—	—
Colector (Solway)	0.30	0.29	0.26	0.21	0.17	0.12	0.00	—	—	—
Microingredientes*	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	—	—	—
Contenido Analizado de:										
Proteína (g/100g dieta)	20.2	20.2	21.5	21.5	22.2	22.7	24.4	—	—	—
Energía (Kcal/g)	4.73	4.41	4.44	4.65	4.51	4.59	4.76	—	—	—
*Microingredientes: agua-sabor, CaCl ₂ , Pre mezcla de vitaminas y minerales, antimicrobico, antioxidante.										

Resultados y Discusiones

La dieta 100% PCh fue deficiente en Met (60%) y Thr (8%) con respecto al perfil de camarón, mientras la dieta 100% PP fue deficiente en Arg (15%) (Fig. 1). La sustitución de hasta 15% de PCh por PP presentó un pobre crecimiento en los camarones, pero incrementó el recambio metabólico del N de estos. A partir de un 30% de PP se aporta un contenido de AA suficiente para complementar el perfil de la PCh y así incrementar el crecimiento de los camarones. Por otro lado, mayores tasas de crecimiento demandan un mayor recambio metabólico del N (Fig. 2).

Fig. 1 Contenido relativo AA en las dietas respecto al perfil en carcas de camarón (22% PC)

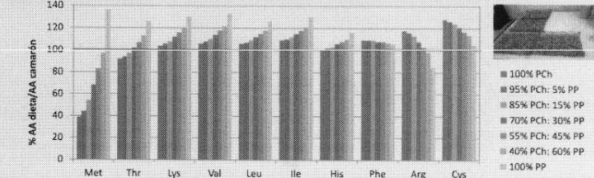
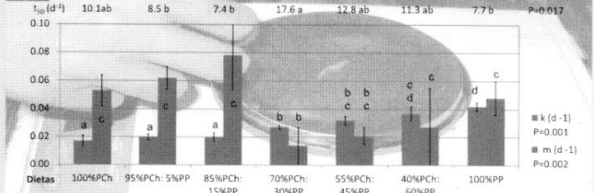


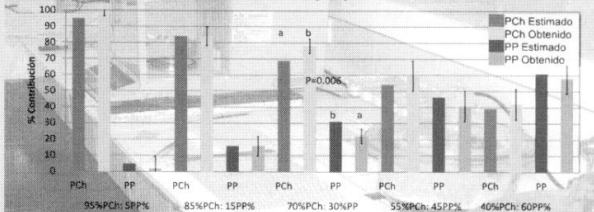
Fig. 2 Estimación del crecimiento y recambio metabólico (modelo Hesselein)



Las letras indican diferencias significativas y P la probabilidad del estadístico. K y m son las contribuciones del nitrógeno dietario al crecimiento y mantenimiento, respectivamente.

Las contribuciones obtenidas de N de las harinas de chícharo y pescado corresponden con las esperadas en la formulación, excepto por las diferencias encontradas en la dieta 70%PCh:30%PP. Una contribución de N significativamente menor del pescado y mayor del chícharo en esta última dieta soporta la idea de que la PP complementó el perfil de AA de la PCh y estimuló el crecimiento del camarón.

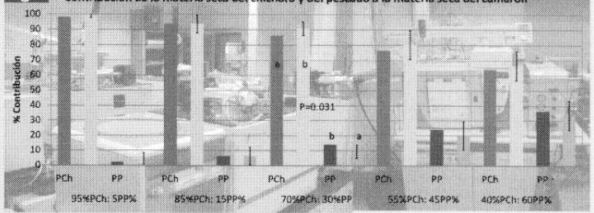
Fig. 3 Contribución del N dietario del chícharo y del pescado al N del camarón



Las contribuciones de materia seca corresponden con las de N. Las diferencias en magnitud se deben a que en la dieta a base de chícharo, éste se incluye en 85% y además de ser una fuente proteica tiene un compartimento importante de carbohidratos contra el 32% de inclusión de pescado.

En contraste con lo reportado para aislado de soya³, la contribución relativa del N y materia seca del chícharo y del pescado al crecimiento del camarón fue semejante a la proporción en que sus proteínas y materia seca fueron mezcladas en la dieta a pesar de la deficiencia de Met.

Fig. 4 Contribución de la materia seca del chícharo y del pescado a la materia seca del camarón



Conclusiones

Las contribuciones de N y materia seca de las harinas de chícharo y pescado al tejido del camarón fueron semejantes a los contenidos dietarios. La mezcla de 70%PCh:30%PP mejora significativamente el perfil de AA permitiendo una mayor contribución de N de la harina de Chícharo.

Referencias

- Cruz-Suárez, L., Ricque-Marie, D., Tapia-Galzar, M., McCallum, I., & Hickling, D. (2001). Assessment of differently processed feed peas (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*, 196, 87-104.
- Casta, D. A., Amisk, C. R., & McCallum, I. (2002). Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 8(2), 87-94.
- Gamboa-Delgado, J., & Le Viv, L. (2009). Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture*, 291, 115-123.