

Digestibilidad Aparente de Energía, Proteína y Materia Seca de Ingredientes Utilizados en Alimentos Balanceados para el Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*

A.J. Siccardi III^{1,*}, A.L. Lawrence¹, D.M. Gatlin III¹, J.M. Fox¹, F.L. Castille¹, M. Perez-Velazquez² y M.L. González-Félix²

¹Texas Agricultural Experiment Station, Shrimp Mariculture Research, Texas A&M University System, 1300 Port Street, Port Aransas, TX 78373. E-mail: smpall@yahoo.com

²Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Rosales y Niños Héroes s/n A.P. 1819 C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México

Resumen

Con el fin de formular alimentos que no únicamente cubran los requerimientos nutricionales de los organismos, sino que a la vez sean del menor costo posible y que causen la menor contaminación, se requieren de coeficientes precisos de proteína y energía digerible de ingredientes comúnmente utilizados en la elaboración de alimentos balanceados para camarón. En este estudio se hicieron determinaciones *in vivo* de la digestibilidad aparente de energía (DAE), proteína cruda (DAPC) y materia seca (DAMS) de treinta ingredientes utilizados en alimentos balanceados para *L. vannamei*, entre los que se incluyeron harinas de pescado, harinas de origen marino, harinas prácticas de origen animal y vegetal e ingredientes purificados. Así mismo, se determinó *in vitro* la DAPC de ingredientes seleccionados utilizando 0.20% o 0.0002% de pepsina. Los coeficientes de DAMS variaron en un intervalo de 4.3% para tierra de diatomeas a 96.5% para gelatina. La DAPC varió de 59.1% para gluten de maíz a 99.7% para gelatina. La DAE varió de 65.4% para gluten de maíz a 102.2% para gelatina. Los valores de DAPC *in vivo* tuvieron una correlación positiva ($r = 0.55$; $P < 0.05$) con los de DAPC *in vitro* obtenidos utilizando 0.0002% de pepsina pero no con los obtenidos utilizando 0.20% de pepsina.

Palabras clave: digestibilidad aparente, energía, proteína, materia seca

Introducción

Aunque el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* ha sido cultivado comercialmente por muchos años, muy pocos estudios se han ocupado de determinar la disponibilidad de la proteína y energía de ingredientes comúnmente utilizados en los alimentos balanceados (Akiyama *et al.*, 1989; Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995). Debido a que la medición directa del coeficiente de digestibilidad es complicada (Smith y Tabrett, 2004), se puede determinar la digestibilidad aparente utilizando métodos *in vivo* tales como el método indirecto con óxido crómico (Akiyama *et al.*, 1989; Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995, Davis *et al.*, 2002), el método indirecto con acetato de iterbio (Smith y Tabrett, 2004) o el método indirecto con dióxido de titanio (Smith y Tabrett, 2004). Típicamente, los estudios realizados con *L. vannamei* han utilizado el método indirecto con óxido crómico (Smith *et al.*, 1985; Davis y Arnold, 1993) debido a la consistencia de los resultados producidos (Akiyama *et al.*, 1989; Smith y Tabrett, 2004).

Se requieren de coeficientes de proteína y energía digerible precisos para formular alimentos balanceados que cubran los requerimientos nutricionales, así como para permitir la substitución efectiva de ingredientes con base en su costo y para reducir la producción de desperdicios. En la actualidad, los alimentos balanceados comerciales están formulados con base en datos derivados de estudios en laboratorio o en estanques en los cuales se miden parámetros de producción sin conocimiento de la disponibilidad de los nutrientes. Ya que estas formulaciones toman en cuenta la composición dietética bruta que produjo un crecimiento “óptimo”, pueden ser formuladas bajo el concepto de menor costo únicamente mediante el ajuste de fuente de proteína, en tanto que se deben mantener fijos los requerimientos dietéticos brutos. Las formulaciones que se basan exclusivamente en la composición dietética bruta, y no en la composición digerible, pueden producir alimentos sobre-formulados, incrementando su costo y los niveles de contaminantes, ya que la proteína es el componente más costoso en alimentos balanceados (Cordova-Murueta y Garcia-Carreno, 2002) y puede ocasionar la acumulación de nitrógeno inorgánico en el agua de cultivo (Velasco *et al.*, 1999).

En 1997 Lee y Lawrence (1997) sugirieron que las regulaciones ambientales podrían tener un papel más determinante que los aspectos económicos en las investigaciones sobre digestibilidad de alimentos balanceados, pero muy pocos estudios se han enfocado a dichos aspectos (Cuzon *et al.*, 2004). Lo anterior es sorprendente pues el alimento constituye una gran parte de los costos de producción (Akiyama *et al.*, 1992; Sarac *et al.*, 1993) y pueden obtenerse ahorros adicionales a través de la optimización de sus formulaciones.

Tan solo hay que echar un vistazo a la industria de engorda de pollos para darse cuenta de que un alimento más eficiente en términos de costo y seguridad ambiental puede ser formulado con base en la digestibilidad (*i.e.*, disponibilidad de nutrientes) de los ingredientes utilizados para su fabricación. Este método de formulación permite la selección de ingredientes que cubran tanto los requerimientos nutricionales de los organismos como aspectos económicos con el fin de obtener la dieta de menor costo. El conocimiento de los coeficientes de digestibilidad de los ingredientes también representa una medida adicional de garantía de calidad, ya que la

A.J. Siccardi III, A.L. Lawrence¹, D.M. Gatlin III, J.M. Fox, F.L. Castille, M. Perez-Velazquez y M.L. González-Félix. 2006. Digestibilidad Aparente de Energía, Proteína y Materia Seca de Ingredientes Utilizados en Alimentos Balanceados para el Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

digestibilidad de los ingredientes puede variar considerablemente dependiendo de factores tales como frescura y tratamiento previo (García-Carreno, 1998). Utilizando los datos disponibles actualmente sobre digestibilidad de energía y proteína no sería posible la formulación de alimentos que causen la menor contaminación. El objetivo del presente estudio fue determinar la digestibilidad aparente de energía, proteína y materia seca de ingredientes seleccionados utilizados en alimentos balanceados para *L. vannamei*.

Materiales y Métodos

Experimentos in vivo

Origen de los organismos

Se obtuvieron postlarvas de *L. vannamei* libres de patógenos específicos del Instituto Oceanográfico (Kailua-Kona, HI) y se sembraron en tanques de fibra de vidrio circulares con un diámetro de 2.44 m. Las postlarvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia sp.* y un alimento balanceado comercial (Rangen 45/10; Rangen Inc., Buhl, ID) dos y diez veces al día, respectivamente. Las postlarvas se mantuvieron en estas condiciones durante aproximadamente 13 semanas para permitir su aclimatación a condiciones de laboratorio (30.1 ± 0.5 °C, 32.2 ± 0.4 ‰) y alcanzar una talla apropiada para el experimento ($9.75 \text{ g} \pm 0.43$; 11.33 ± 0.61).

Sistema experimental

El sistema experimental consistió de 60 tanques rectangulares (volumen de 119 L; área superficial de 0.3 m^2) conectados a un sistema de recirculación semi-cerrado (tasa de recambio de agua diario de 10%) bajo techo de 43,000 L. El agua de mar utilizada fue bombeada a través de un filtro de arena para alcanzar una tasa de recirculación de $1.89 \text{ L min}^{-1} \text{ tanque}^{-1}$ (recambio de $2,400\% \text{ tanque}^{-1} \text{ día}^{-1}$). Se proveyó de un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad con iluminación fluorescente. Se sembraron en cada tanque treinta camarones de 8-10 g de peso para obtener una biomasa de $270 \pm 20 \text{ g}$. Se monitorizó diariamente la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto con un oxímetro (YSI 85® Meter, YSI Inc., Yellow Springs, OH). Las concentraciones de nitrógeno amoniacal, $\text{NO}_2\text{-N}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$ se midieron semanalmente siguiendo adaptaciones a los métodos descritos por Spotte (1979a,b), Solarzano (1969), Mullen y Riley (1955) y Strickland y Parsons (1972). El pH se midió semanalmente con un potenciómetro (Brinkman Metrohm® pH meter).

Preparación de alimentos y determinación de digestibilidad

Se determinó la digestibilidad aparente de energía, proteína y materia seca de 32 ingredientes utilizados para formular alimentos para *L. vannamei* (Tabla 1). El bioensayo de digestibilidad siguió el método indirecto con óxido crómico descrito por Cho et al. (1982). Se prepararon 35 kg de una mezcla base con contenido proteico y energético de 35% y 8.41 kJ g^{-1} , respectivamente (Tabla 2), con la que se preparó tanto una dieta de referencia como las distintas dietas experimentales, lo que aseguró la uniformidad entre dietas. Todos los ingredientes de la dieta de referencia, con excepción del alginato y el metafosfato de sodio, se mezclaron en una mezcladora

de alimentos (Modelo L-800, Hobart Corporation, Troy, Ohio, EUA) durante 3 horas. Un kilo de la dieta de referencia y 32 dietas experimentales compuestas de 700 g kg⁻¹ de dieta de referencia y 300 g kg⁻¹ del ingrediente de prueba se mezclaron individualmente en una mezcladora de alimentos (Modelo A-200, Hobart Corporation, Troy, Ohio, EUA) durante 40 minutos. En un recipiente separado, se preparó una mezcla de alginato, metafosfato de sodio y agua desionizada (400 ml kg⁻¹) utilizando una mezcladora manual (Sunbeam Products Inc., Milford, Massachusetts, EUA) durante 45 segundos. La mezcla de alginato se agregó subsecuentemente a los ingredientes secos y se mezcló por un minuto para obtener una consistencia apropiada para su extrusión, la cual se realizó utilizando un accesorio para corte de carne (Modelo A-200, Hobart Corporation, Troy, Ohio, EUA) equipado con un dado con orificios de 3 mm. Las dietas experimentales se secaron en un horno a 35 °C hasta obtener un contenido de humedad de 8-10%. Las dietas se molieron con un mortero hasta obtener un tamaño de partícula de 2-4 mm y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Tabla 1. Ingredientes de prueba utilizados en los bioensayos de digestibilidad.

No. Bioensayo	No. Internacional	Ingrediente	No. Bioensayo	No. Internacional	Ingrediente
1		Harina de sangre (Convencional) ¹	1		Harina de pescado (Especies Misc.-Asiáticas) ²
1	5-00-381	Harina de sangre (Secada en espray) ¹	1		Harina de pescado (Especies Misc.-Perú) ²
1	5-01-162	Caseína ⁴	1	5-14-503	Gelatina ⁴
2	5-28-242	Gluten de maíz ¹	2		Harina de Kril ¹
2	5-01-663	Harina de cangrejo ¹	2		Harina de Kril ²
1		Tierra de diatomeas ⁵	1	5-03-798	Harina de subproducto de pollo ¹ extraído con solvente
2	5-02-141	Granos de destilería ¹	2	5-04-612	Harina de soya (48% Solvente extraído) ¹
1	5-03-795	Harina de plumas ¹	2	5-04-597	Harina de soya (Grasa completa) ¹ integral
1	5-01-985	Harina de pescado (Anchoveta) ¹	2	5-08-038	Harina de soya (Aislado, 90%) ¹
1	5-01-985	Harina de pescado (Anchoveta-Perú) ²	2		Calamar (Harina de hígado –Asiática) ²
1	5-02-000	Harina de pescado (Arenque) ¹	2		Calamar (Harina de músculo) ¹
1		Harina de pescado (Hoki-Nueva Zelanda) ²	2		Calamar (Harina de músculo) ¹
1	5-01-985	Harina de pescado (Macarela-Chile) ²	2		Calamar (Entero) ¹
1	5-02-009	Harina de pescado (Menhaden) ¹	2		Calamar (Entero, Asiático) ²
1	5-02-009	Harina de pescado (Menhaden) ¹	1		Gluten de trigo ⁴
1	5-01-977	Harina de pescado (Menhaden) ³	1		Almidón de trigo ⁴

¹Zeigler Brothers, Gardners, PA, EUA. ²Evalis, Vannes Cedex, Francia. ³Omega Protein Corporation Inc., Houston, TX, EUA. ⁴MP Biomedicals, Cleveland, OH, EUA. ⁵Sigma, St. Louis, MO, EUA. ⁶The J. M. Smucker Company, Orrville, OH, EUA.

Tabla 2. Composición de la dieta de referencia con contenido proteico de 35% y contenido energético de 8.40 kJ g⁻¹.

Ingrediente	Nivel de inclusión (g kg ⁻¹)	Ingrediente	Nivel de inclusión (g kg ⁻¹)
Alginato ⁵	20.00	Harina de Kril ¹	105.00
Carbonato de calcio ²	14.60	Premezcla de minerales y vitaminas ^{1,A}	2.70
Celulosa ⁴	20.00	MgO ₃	17.30
Colesterol ²	2.00	Fosfolípido ¹	42.00
Óxido crómico ³	10.00	Metafosfato de sodio ³	10.00
Fosfato Dicálcio ²	65.60	Harina de calamar ¹	150.00
Harina de pescado ⁶	150.00	Vitamina C ¹	0.50
Harina de soya (Aislado, 90%) ¹	79.40	Premezcla de minerales y vitaminas ^{1,B}	2.30
KCl ³	18.50	Almidón de trigo ²	290.10
Proteína cruda (%)	35.00*	Energía, kcal g ⁻¹	2.01*
Proteína digerible (%)	31.63*	Energía digerible, kcal g ⁻¹	1.72*
Ceniza (%)	17.01*	Lípido (%)	8.03*

¹Zeigler Brothers, Gardners, PA, EUA.

²MP Biomedicals, Cleveland, OH, EUA.

³Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA.

⁴Sigma, St. Louis, MO, EUA.

⁵Keltone HV Alginate, NutraSweet-Kelco Company, Chicago, IL, EUA.

⁶Omega Protein Corporation Inc., Houston, TX, EUA.

⁷Composición de ingredientes de la premezcla.

^AVéase Apéndice A para la composición.

^BVéase Apéndice B para la composición.

*Calculado con base en el alimento tal como se ofreció.

Colecta de muestras

El primer bioensayo de digestibilidad consistió de 19 dietas de prueba y la dieta de referencia asignadas aleatoriamente a 60 tanques con tres réplicas por cada dieta. Los camarones fueron aclimatados a las dietas de prueba y a las condiciones de cultivo con 4 días de anticipación al inicio de la colecta de heces. Al inicio de cada día de colecta, se retiraron las heces y las exuvias de los tanques mediante sifoneo. Se alimentó a los camarones con 0.2 g de dieta por individuo por hora durante 6 horas consecutivas. El alimento no consumido se retiró de los tanques cada hora antes de cada alimentación para evitar pérdidas por lixiviación. Las heces se colectaron una hora después de cada alimentación mediante sifoneo en un filtro de luz de malla de 42 µm. Las heces se enjuagaron con agua desionizada, se transfirieron a viales etiquetados individualmente y se congelaron a -84°C hasta el momento de su análisis. Cada día, las heces de la primera hora de colecta de desecharon para minimizar la influencia de materia fecal consumida previamente. Las heces de cada tanque se combinaron de modo tal que cada réplica consistió de las heces de un tanque colectadas a lo largo de cuatro días consecutivos. El procedimiento anterior se repitió para las 13 dietas de prueba restantes y para la dieta de

referencia utilizando camarones de 11.33 ± 0.61 g de peso. Con el fin de evaluar el efecto de la talla de los organismos sobre la digestibilidad, el procedimiento anterior se repitió para la dieta de referencia utilizando organismos con pesos de 8.65 ± 0.29 , 13.14 ± 0.08 y 15.09 ± 0.08 g.

Análisis de dietas y heces

Previo al análisis proximal, las dietas de prueba y las heces fueron liofilizadas, molidas hasta obtener un polvo fino utilizando un mortero, y analizadas en cuanto a porcentaje de materia seca (AOAC, 1990). Las determinaciones de proteína (AOAC Método 990.3; Determinador de Nitrógeno/Proteína FP-528, Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA), energía (Calorímetro modelo 1241; Parr Instrument Co., Moline, IL, EUA) y óxido crómico (McGinnis and Kasting, 1964) fueron realizadas subsecuentemente para cada muestra liofilizada y reportadas con base en materia seca. Los valores de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) para las dietas de prueba y la dieta de referencia se calcularon mediante la siguiente ecuación (Pond et al. 1995):

$$\text{CDA (\%)} = 100 - \frac{\% \text{ indicador in la dieta}}{\% \text{ indicador en heces}} \times \frac{\% \text{ nutriente en heces}}{\% \text{ nutriente en la dieta}} \times 100$$

en donde el indicador es el óxido crómico y el nutriente es la materia seca, proteína o energía. Para determinar el CDA para la materia seca, proteína y energía de los ingredientes de prueba se utilizó la siguiente ecuación (Bureau y Hua, 2006):

Para todos los ingredientes de prueba:

$$\text{CDA}_{\text{ingrediente prueba}} = \text{CDA}_{\text{dieta de prueba}} + \left[\frac{(\text{CDA}_{\text{dieta de prueba}} - \text{CDA}_{\text{dieta de referencia}}) \times (0.7 \times \text{D}_{\text{referencia}} / 0.3 \times \text{D}_{\text{ingrediente}})}{\text{D}_{\text{referencia}} / 0.3 \times \text{D}_{\text{ingrediente}}} \right]$$

donde $\text{D}_{\text{referencia}}$ = % nutriente (o kcal g⁻¹ de energía bruta) de la mezcla base de la dieta de referencia; $\text{D}_{\text{ingrediente}}$ = % nutriente (o kcal g⁻¹ de energía bruta) del ingrediente de prueba.

Análisis estadístico

Los valores de CDA se sometieron a Análisis de Varianza utilizando el programa SPSS para determinar si existían diferencias significativas entre los ingredientes. Dichas diferencias fueron identificadas mediante el método de Bonferroni utilizando un nivel de significancia de $P < 0.05$

Experimentos in vitro

Análisis in vitro de ingredientes seleccionados

Catorce ingredientes (harina de sangre convencional, harina de sangre secada en espray, gluten de maíz, harina de cangrejo, granos de destilería, harina de plumas, harina de anchoveta, harina de arenque, harina de pescado Menhaden, harina de subproducto de pollo, harina de soya 48% extraída con solvente, harina de soya integral, harina de

músculo de calamar de Lima, harina de músculo de calamar de Paita) fueron enviados a Zeigler Brothers, Gardners, Pensilvania, EUA para aplicárseles análisis *in vitro* de DAP utilizando ya sea 0.20% o 0.0002% de pepsina. Los valores de CDA se sometieron a análisis de correlación utilizando el programa SPSS para determinar la bondad de ajuste de la regresión entre los coeficientes de digestibilidad de proteína *in vivo* e *in vitro*.

Resultados

Experimentos in vivo

Calidad de agua

Para asegurar que los desechos nitrogenados no interfirieran con los experimentos, el nitrógeno amoniacal debe mantenerse por debajo de 2.37 mg L⁻¹ (0.09 mg L⁻¹ para NH₃-N; Chen y Lin 1991) y los nitritos debajo de 2.04 mg L⁻¹ (Chen y Lin 1991). Los valores obtenidos durante el experimento estuvieron por debajo de estas recomendaciones, lo que sugiere que los organismos se mantuvieron bajo condiciones de cultivo óptimas a lo largo de las cuatro semanas de duración del experimento.

Efecto de la talla sobre los coeficientes de digestibilidad

Se observaron diferencias significativas entre los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda (DAPC) de las cinco distintas clases de talla de *L. vannamei* (Tabla 3). Los coeficientes de DAPC fueron significativamente mayores para los organismos de 8.56 g que para todas las otras clases de talla. No hubo diferencias significativas entre la DAPC de las tres clases de talla mayores (11.33, 13.14, 15.09 g), en tanto que la segunda clase de talla (9.75 g) tuvo una DAPC significativamente mayor que la de las dos clases de talla más grandes (13.14, 15.09 g), pero no mayor a la de la tercera clase de talla (11.33 g). No se observaron diferencias significativas entre ninguna de las clases de talla con respecto a los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) (rango: 70.58-72.06%) o de energía (DAE) (rango: 84.30-86.00%).

Tabla 3. Efecto del peso promedio sobre la digestibilidad *in vivo* de *L. vannamei* alimentado con una dieta estándar de referencia con contenido proteico de 35%¹.

Peso promedio (g) ²	DAMS (%)	DAPC (%)	DAE (%)
8.56±0.29 ^a	71.45±2.36 ^f	90.38±0.66 ⁱ	85.20±0.79 ^j
9.75±0.43 ^b	72.06±0.88 ^f	89.10±0.42 ^h	86.00±0.19 ^j
11.33±0.61 ^c	70.58±2.35 ^f	88.44±0.11 ^{gh}	85.48±0.45 ^j
13.14±0.08 ^d	71.58±2.25 ^f	87.95±0.34 ^g	85.85±0.92 ^j
15.09±0.08 ^e	70.77±2.74 ^f	87.79±0.25 ^g	84.30±0.61 ^j

¹Promedio ± Desv. Est. Los valores con un mismo superíndice no son diferentes significativamente ($P > 0.05$).

²Peso promedio obtenido al inicio del 4º. día del experimento ± Desv. Est. (N = 3).

Digestibilidad aparente de materia seca

Los coeficientes de DAMS de los ingredientes se presentan en las Tablas 4 y 5. Los valores de DAMS variaron en un intervalo de 4.3% para la tierra de diatomeas a 96.5% para la gelatina. Las harinas purificadas (rango: 89.4-96.5) tuvieron una DAMS significativamente mayor que todos los demás ingredientes, teniendo la gelatina el valor más alto. Hubo diferencias significativas entre los coeficientes de DAMS de las distintas harinas de pescado (rango: 55.8-78.3%) y estuvieron correlacionadas inversamente con el contenido de ceniza ($r = -0.89$; $P < 0.0001$). No se observaron diferencias significativas entre los coeficientes de DAMS de las dos harinas de anchoveta. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre la DAMS de las harinas de pescado (Menhaden). También se observaron diferencias significativas entre los coeficientes de DAMS de las harinas de origen vegetal (rango: 41.8 to 78.7%), pero sin existir una correlación entre los coeficientes y el contenido de ceniza ($P > 0.05$). El segundo valor más bajo del contenido de ceniza entre todos los ingredientes correspondió al del gluten de maíz y su coeficiente de DAMS (41.8%) fue significativamente mayor únicamente que el de la tierra de diatomeas (4.3%). Los valores de DAMS de las harinas prácticas de origen animal (rango: 57.0-63.9%) fueron menos variables que los de las harinas de origen marino (rango: 43.3-81.7%).

Tabla 4. Contenido porcentual de ceniza, proteína base seca (PBS), digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y digestibilidad aparente de proteína cruda (DAPC) de ingredientes consumidos por *L. vannamei*.*

Ingrediente	Ceniza (%)	PBS (%)	DAMS (%)	DAPC (%)
Harina de sangre (Convencional) ^{1,C}	1.56 ± 0.09	97.6 ± 0.5	57.0 ± 3.8 ^{l,m}	66.2 ± 1.6 ^l
Harina de sangre (Secada en espray) ^{1,C}	2.84 ± 0.01	99.1 ± 0.5	63.4 ± 4.5 ^{h,i,j,k,l}	70.8 ± 1.8 ^k
Caseína ^{4,E}	0.73 ± 0.01	95.9 ± 0.2	89.5 ± 1.4 ^b	96.4 ± 1.0 ^b
Gluten de maíz ^{1,D}	1.48 ± 0.02	71.6 ± 0.0	41.8 ± 1.0 ^o	59.1 ± 1.9 ^m
Harina de cangrejo ^{1,B}	44.77 ± 0.59	33.3 ± 0.8	43.3 ± 1.4 ^{n,o}	84.0 ± 1.9 ^{f,g,h}
Granos de destilería ^{1,D}	5.02 ± 0.13	30.4 ± 0.6	47.2 ± 3.7 ⁿ	78.5 ± 1.4 ^{i,j}
Harina de plumas ^{1,C}	2.74 ± 0.04	86.7 ± 0.1	61.3 ± 0.9 ^{j,k,l,m}	63.9 ± 0.7 ^l
Harina de pescado (Anchoveta) ^{1,A}	14.99 ± 0.23	70.0 ± 0.8	78.3 ± 2.3 ^{c,d}	87.9 ± 0.7 ^{d,e,f}
Harina de pescado (Anchoveta-Perú) ^{2,A}	14.37 ± 0.16	74.4 ⁵	78.0 ± 1.0 ^{c,d}	88.5 ± 2.4 ^{d,e}
Harina de pescado (Arenque) ^{1,A}	12.21 ± 0.03	78.7 ± 0.6	72.7 ± 3.9 ^{d,e,f,g}	90.1 ± 1.1 ^{d,e}
Harina de pescado (Hoki-Nueva Zelanda) ^{2,A}	17.76 ± 1.55	71.9 ⁵	67.1 ± 2.0 ^{g,h,i,j,k}	88.1 ± 1.0 ^{d,e,f}
Harina de pescado (Macarela-Chile) ^{2,A}	16.92 ± 0.00	74.7 ⁵	73.5 ± 3.9 ^{d,e,f,g}	88.8 ± 2.8 ^{d,e}
Harina de pescado (Menhaden) ^{1,A}	20.09 ± 0.21	68.3 ± 0.2	68.1 ± 2.1 ^{f,g,h,I,j}	89.0 ± 2.2 ^{d,e}
Harina de pescado (Menhaden) ^{1,A}	29.15 ± 0.35	61.8 ± 0.4	55.6 ± 3.7 ^m	83.7 ± 0.7 ^{g,h}
Harina de pescado (Menhaden) ^{3,A}	21.25 ± 0.09	68.9 ± 0.6	60.2 ± 0.5 ^{k,l,m}	83.2 ± 1.4 ^h
Harina de pescado (Esp. Misc. -Asiáticas) ^{2,A}	22.66 ± 0.51	65.4 ⁵	55.8 ± 4.0 ^m	78.6 ± 0.9 ^{i,j}
Harina de pescado (Esp. Misc. -Peru) ^{2,A}	16.17 ± 0.04	71.8 ⁵	70.7 ± 4.0 ^{e,f,g}	87.6 ± 2.6 ^{e,f,g}
Gelatina ^{4,E}	0.06 ± 0.00	112.4 ± 0.0	96.5 ± 1.9 ^a	99.7 ± 1.9 ^a
Harina de Kril ^{1,B}	12.23 ± 0.25	70.2 ± 1.2	72.6 ± 0.2 ^{d,e,f,g}	80.5 ± 1.1 ⁱ
Harina de Kril ^{2,B}	9.52 ± 0.05	62.8 ⁵	81.7 ± 1.0 ^c	89.4 ± 1.1 ^{d,e}
Harina de subproducto de pollo ^{1,C}	16.80 ± 0.07	68.3 ± 1.6	63.9 ± 3.9 ^{h,i,j,k,l}	78.7 ± 1.7 ^{i,j}
Harina de soya (48% Extraída con solventes) ^{1,D}	7.40 ± 0.12	51.6 ± 0.1	75.9 ± 1.6 ^{c,d,e}	92.9 ± 0.3 ^{b,c}
Harina de soya (Integral) ^{1,D}	5.31 ± 0.08	42.5 ± 0.3	63.5 ± 2.2 ^{h,i,j,k,l}	87.1 ± 1.8 ^{e,f,g,h}
Harina de soya (Aislado, 90%) ^{1,D}	4.65 ± 0.02	89.6 ± 0.3	78.7 ± 0.7 ^{c,d}	93.7 ± 0.8 ^{b,c}
Calamar (Harina de hígado -Asiática) ^{2,B}	6.27 ± 0.15	53.5 ⁵	61.8 ± 3.3 ^{i,j,k,l,m}	66.4 ± 1.9 ^l
Calamar (Harina de músculo-Lima) ^{1,B}	4.22 ± 0.59	91.4 ± 0.3	69.8 ± 4.6 ^{e,f,g,h}	84.6 ± 2.4 ^{f,g,h}

Table 4. Continuación

Ingrediente	Ceniza (%)	PBS (%)	DAMS (%)	DAPC (%)
Calamar (Harina de músculo -Paita) ^{1,B}	3.84 ± 0.03	90.1 ± 0.2	74.7 ± 1.4 ^{d,e,f}	86.6 ± 0.8 ^{e,f,g,h}
Calamar (Entero) ^{1,B}	4.24 ± 0.05	88.9 ± 0.1	68.6 ± 1.0 ^{f,g,h,i}	84.5 ± 1.9 ^{f,g,h}
Calamar (Entero, Asiático) ^{2,B}	10.20 ± 0.08	73.0 ⁵	61.9 ± 0.8 ^{i,j,k,l,m}	75.4 ± 0.9 ^j
Gluten de trigo ^{4,E}	0.65 ± 0.00	83.7 ± 0.5	89.4 ± 1.0 ^b	95.8 ± 0.6 ^b

Los valores son promedios de tres determinaciones ± Desv. Est.

*Los promedios con un mismo superíndice no son diferentes significativamente ($P > 0.05$).

¹Zeigler Brothers, Gardners, PA, EUA.

²Evalis, Vannes Cedex, Francia.

³Omega Protein Corporation Inc., Houston, TX, EUA.

⁴MP Biomedicals, Cleveland, OH, EUA.

⁵Resultados aportados por Evalis, Vannes Cedex, Francia.

^AHarinas de pescado.

^BHarinas de origen marino.

^CHarinas prácticas de origen animal.

^DHarinas prácticas de origen vegetal.

^EIngredientes purificados.

Tabla 5. Contenido porcentual de ceniza, energía base seca (EBS), digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y digestibilidad aparente de energía (DAE) de ingredientes consumidos por *L. vannamei*.*

Ingrediente	Ceniza (%)	EBS (kcal g ⁻¹)	DAMS (%)	DAE (%)
Harina de sangre (Convencional) ^{1,C}	1.56 ± 0.09	5.74 ± 0.05	57.0 ± 3.8 ^{l,m}	72.2 ± 1.6 ^{ij}
Harina de sangre (Secada en espray) ^{1,C}	2.84 ± 0.01	5.91 ± 0.06	63.4 ± 4.5 ^{h,i,j,k,l}	75.1 ± 2.1 ^{hi}
Caseína ^{4,E}	0.73 ± 0.01	5.74 ± 0.02	89.5 ± 1.4 ^b	100.9 ± 1.8 ^a
Gluten de maíz ^{1,D}	1.48 ± 0.02	5.67 ± 0.00	41.8 ± 1.0 ^o	65.4 ± 1.7 ^l
Harina de cangrejo ^{1,B}	44.77 ± 0.59	2.64 ± 0.04	43.3 ± 1.4 ^{n,o}	80.6 ± 1.9 ^{f,g}
Tierra de diatomeas ^{5,E}	99.23 ± 0.08	0.15 ± 0.00	4.3 ± 2.1 ^p	80.6 ± 2.1 ^{f,g}
Granos de destilería ^{1,D}	5.02 ± 0.13	5.33 ± 0.03	47.2 ± 3.7 ⁿ	69.6 ± 1.4 ^{ik}
Harina de plumas ^{1,C}	2.74 ± 0.04	5.91 ± 0.01	61.3 ± 0.9 ^{i,k,l,m}	72.7 ± 0.2 ^{ij}
Harina de pescado (Anchoveta) ^{1,A}	14.99 ± 0.23	5.16 ± 0.01	78.3 ± 2.3 ^{c,d}	89.5 ± 0.5 ^b
Harina de pescado (Anchoveta-Perú) ^{2,A}	14.37 ± 0.16	4.77 ± 0.02	78.0 ± 1.0 ^{c,d}	87.1 ± 2.1 ^{b,c,d}
Harina de pescado (Arenque) ^{1,A}	12.21 ± 0.03	5.30 ± 0.01	72.7 ± 3.9 ^{d,e,f,g}	89.4 ± 0.7 ^b
Harina de pescado (Hoki-Nueva Zelanda) ^{2,A}	17.76 ± 1.55	4.62 ± 0.03	67.1 ± 2.0 ^{g,h,i,j,k}	88.8 ± 1.2 ^{b,c}
Harina de pescado (Macarela-Chile) ^{2,A}	16.92 ± 0.00	4.54 ± 0.04	73.5 ± 3.9 ^{d,e,f,g}	88.3 ± 2.1 ^{b,c}
Harina de pescado (Menhaden) ^{1,A}	20.09 ± 0.21	4.80 ± 0.03	68.1 ± 2.1 ^{f,g,h,i,j}	88.4 ± 2.0 ^{b,c}
Harina de pescado (Menhaden) ^{1,A}	29.15 ± 0.35	4.42 ± 0.03	55.6 ± 3.7 ^m	83.3 ± 1.2 ^{c,d,e,f,g}
Harina de pescado (Menhaden) ^{3,A}	21.25 ± 0.09	4.64 ± 0.01	60.2 ± 0.5 ^{k,l,m}	86.7 ± 1.9 ^{b,c,d,e}
Harina de pescado (Esp. Misc. -Asiáticas) ^{2,A}	22.66 ± 0.51	4.14 ± 0.02	55.8 ± 4.0 ^m	81.3 ± 1.0 ^{f,g}
Harina de pescado (Esp. Misc. -Peru) ^{2,A}	16.17 ± 0.04	4.76 ± 0.01	70.7 ± 4.0 ^{e,f,g}	87.3 ± 1.6 ^{b,c,d}
Gelatina ^{4,E}	0.06 ± 0.00	5.14 ± 0.02	96.5 ± 1.9 ^a	102.2 ± 2.0 ^a
Harina de Kril ^{1,B}	12.23 ± 0.25	5.19 ± 0.01	72.6 ± 0.2 ^{d,e,f,g}	80.6 ± 0.9 ^{f,g}
Harina de Kril ^{2,B}	9.52 ± 0.05	5.47 ± 0.02	81.7 ± 1.0 ^c	87.2 ± 0.6 ^{b,c,d}
Harina de subproducto de pollo ^{1,C}	16.80 ± 0.07	4.94 ± 0.02	63.9 ± 3.9 ^{h,i,j,k,l}	82.1 ± 1.3 ^{d,e,f,g}
Harina de soya (48% extraída con solventes) ^{1,D}	7.40 ± 0.12	4.42 ± 0.01	75.9 ± 1.6 ^{c,d,e}	85.6 ± 0.7 ^{b,c,d,e,f}
Harina de soya (Integral) ^{1,D}	5.31 ± 0.08	5.56 ± 0.03	63.5 ± 2.2 ^{h,i,j,k,l}	80.8 ± 1.9 ^{f,g}
Harina de soya (Aislado, 90%) ^{1,D}	4.65 ± 0.02	5.38 ± 0.01	78.7 ± 0.7 ^{c,d}	95.0 ± 5.5 ^{a,b}
Calamar (Harina de hígado -Asiática) ^{2,B}	6.27 ± 0.15	5.33 ± 0.03	61.8 ± 3.3 ^{i,j,k,l,m}	74.0 ± 1.5 ^{ij}

Tabla 5. Continuación

Ingredient	Ceniza (%)	EBS (kcal g ⁻¹)	DAMS (%)	DAE (%)
Calamar (Harina de músculo-Lima) ^{1,B}	4.22 ± 0.59	5.63 ± 0.02	69.8 ± 4.6 ^{e,f,g,h}	81.8 ± 1.6 ^{e,f,g}
Calamar (Harina de músculo -Paita) ^{1,B}	3.84 ± 0.03	5.69 ± 0.01	74.7 ± 1.4 ^{d,e,f}	84.1 ± 0.7 ^{b,c,d,e,f}
Calamar (Entero) ^{1,B}	4.24 ± 0.05	5.61 ± 0.01	68.6 ± 1.0 ^{f,g,h,i}	67.6 ± 7.8 ^{k,l}
Calamar (Entero, Asiático) ^{2,B}	10.20 ± 0.08	4.73 ± 0.01	61.9 ± 0.8 ^{i,j,k,l,m}	78.5 ± 1.4 ^{g,h}
Gluten de trigo ^{4,E}	0.65 ± 0.00	5.65 ± 0.01	89.4 ± 1.0 ^b	99.5 ± 1.4 ^a
Almidón de trigo ^{4,E}	0.21 ± 0.01	4.17 ± 0.02	92.3 ± 2.3 ^{a,b}	98.9 ± 0.9 ^a

Los valores son promedios de tres determinaciones ± Desv. Est.

* Los promedios con un mismo superíndice no son diferentes significativamente ($P > 0.05$).

¹Zeigler Brothers, Gardners, PA, EUA.

²Evalis, Vannes Cedex, Francia.

³Omega Protein Corporation Inc., Houston, TX, EUA.

⁴MP Biomedicals, Cleveland, OH, EUA.

⁵Sigma, St. Louis, MO, EUA.

^AHarinas de pescado.

^BHarinas de origen marino.

^CHarinas prácticas de origen animal.

^DHarinas prácticas de origen vegetal.

^EIngredientes purificados.

Digestibilidad aparente de proteína cruda

Los coeficientes de DAPC variaron de 59.1% para el gluten de maíz a 99.7% para la gelatina. Los coeficientes de DAPC de todos los ingredientes purificados (rango: 95.8-99.7%) fueron mayores a 95%, entre los cuales la gelatina tuvo el mayor valor (99.7%). Los valores de DAPC de las harinas de pescado (rango: 78.6-90.1%) fueron menores que los de los ingredientes purificados pero mayores que los de las restantes clasificaciones de ingredientes. Los productos de soya (48% extraído con solvente y aislada 90%) tuvieron valores de DAPC significativamente mayores que todas las otras harinas prácticas de origen vegetal (rango: 59.1-93.7%), que las harinas de pescado, las harinas de origen marino y las harinas prácticas de origen animal, mientras que el gluten de maíz (59.1%) tuvo el menor valor de DAPC de todos los ingredientes. Los coeficientes de DAPC de todas las harinas prácticas de origen animal estuvieron en el tercio menor de todos los ingredientes, teniendo la harina de plumas y harinas de sangre (convencional y secada en spray) tres de los cinco valores de DAPC más bajos. Las harinas de origen marino tuvieron valores de DAPC desde 66.4% para la harina de hígado de calamar asiática hasta 89.4% para la harina de kril. No se observaron diferencias significativas entre las dos distintas harinas de músculo de calamar. Sin embargo, hubo diferencias estadísticas entre las dos distintas harinas de calamar entero. Los valores de DAPC no estuvieron correlacionados con el contenido de proteína cruda, energía o ceniza de los ingredientes ($P > 0.05$).

Digestibilidad aparente de energía

Los coeficientes de DAE variaron de 65.4% para el gluten de maíz a 102.2% para la gelatina. Como grupo, los ingredientes purificados tuvieron los mayores coeficientes de DAE, oscilando de 80.6% para la tierra de diatomeas a 102.2% para la gelatina, que tuvo el valor más alto pero el cual no fue significativamente mayor a los de la caseína, harina de soya (aislada 90%), gluten de trigo y almidón de trigo. Los valores de DAE de la harina de pescado Menhaden (83.3%) y de especies misceláneas asiáticas (81.3) fueron menores que los de todas las otras harinas de pescado (rango: 81.3-89.5%) y corresponden a los dos coeficientes más bajos de DAE en el grupo. No obstante, la variabilidad en los coeficientes de DAE fue menor que en los coeficientes de DAMS. Los valores de DAE de las harinas prácticas de origen vegetal (rango: 65.4-89.5%) muestran el más alto grado de variabilidad. La harina de gluten de maíz tuvo una DAE (65.4%) significativamente menor a la de todos los otros ingredientes, mientras que la harina de soya (aislada 90%) tuvo una DAE (95%) que no fue significativamente menor a la del ingrediente con el más alto valor numérico (gelatina con 102.2%). Como grupo, las harinas prácticas de origen animal (rango: 72.2-82.1%) tuvieron el menor promedio de DAE y contenido de ceniza entre todas las clasificaciones de ingredientes. La harina de subproducto de pollo tuvo el más alto contenido de ceniza y un valor de DAE significativamente más alto que el de todos los otros ingredientes dentro del grupo. Los coeficientes de DAE de las harinas de origen marino oscilaron de 67.6% para la harina de hígado de calamar a 87.2% para la harina de kril. No se observaron diferencias significativas entre los valores de DAE de las

harinas de músculo de calamar, pero si se detectaron diferencias significativas entre los dos productos de harina de calamar entero. La DAE tuvo una correlación positiva ($r = 0.91$, $P < 0.0001$) con la DAPC, pero no con los contenidos de proteína cruda, energía o ceniza ($P > 0.05$) de los ingredientes.

Experimentos in vitro

Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda

Los valores de DAPC *in vitro* obtenidos utilizando 0.20% de pepsina variaron de 76.6% para la harina de cangrejo a 97.6% para la harina de sangre (convencional) y de 36.7% para la harina de plumas a 98.3% para la harina de sangre (convencional) utilizando 0.0002% de pepsina (Tabla 6). Los valores de DAPC *in vivo* tuvieron una correlación positiva ($r = 0.55$; $P < 0.05$) con los valores de DAPC *in vitro* obtenidos utilizando 0.0002% de pepsina pero no con los obtenidos utilizando 0.20% de pepsina.

Tabla 6. Comparación entre digestibilidad *in vivo* de *L. vannamei* y digestibilidad *in vitro* utilizando pepsina.

Ingrediente	Digestibilidad <i>in vivo</i>		0.20% Pepsina	0.0002% Pepsina
	DAMS ¹	DAPC ¹	DAPC ¹	DAPC ¹
Harina de sangre (Convencional) ²	57.0 ± 3.8	66.2 ± 1.6	97.6	98.3
Harina de sangre (Secada en espray) ²	63.4 ± 4.5	70.8 ± 1.8	93.3	96.1
Gluten de maíz ²	41.8 ± 1.0	59.1 ± 1.9	97.7	45.3
Harina de cangrejo ²	43.3 ± 1.4	84.0 ± 1.9	76.6	61.0
Granos de destilería ²	47.2 ± 3.7	78.5 ± 1.4	79.3	41.7
Harina de plumas ²	61.3 ± 0.9	63.9 ± 0.7	86.9	36.7
Harina de pescado (Anchoveta) ²	78.3 ± 2.3	87.9 ± 0.7	95.3	88.6
Harina de pescado (Arenque) ²	72.7 ± 3.9	90.1 ± 1.1	94.3	85.4
Harina de pescado (Menhaden) ²	68.1 ± 2.1	89.0 ± 2.2	96.4	93.6
Harina de subproducto de pollo ²	63.9 ± 3.9	78.7 ± 1.7	92.0	61.7
Harina de soya (48% Extraído con solvente) ²	75.9 ± 1.6	91.9 ± 0.3	92.9	83.6
Harina de soya (Integral) ²	63.5 ± 2.2	87.1 ± 1.8	95.2	89.6
Calamar (Harina de músculo-Lima) ²	69.8 ± 2.6	84.6 ± 2.4	97.4	81.9
Calamar (Harina de músculo - Paíta) ²	74.7 ± 1.4	86.6 ± 0.8	96.1	82.9

¹Valores reportados como porcentaje ± Desv. Est., donde aplica.

²Zeigler Brothers, Gardners, PA, EUA.

Discusión

Experimentos in vivo

Calidad de agua

Los valores de los parámetros de calidad de agua estuvieron por debajo de los límites máximos recomendados para cultivo de camarón, lo que sugiere que los organismos

fueron mantenidos en condiciones óptimas a lo largo del período de colecta de heces del presente estudio.

Efecto de la talla sobre los coeficientes de digestibilidad

Se detectaron diferencias significativas entre los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda (DAPC) de las cinco distintas clases de talla de *L. vannamei* alimentadas con la dieta de referencia. Smith et al. (1985) no observaron diferencias en la digestibilidad de proteína o de alimentos en individuos de *L. vannamei* de peso corporal entre 10 y 15 g, que recibieron dietas con contenidos de proteína de 22, 30 y 38%. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas entre la digestibilidad de proteína de organismos entre 11.75 y 15.09 g, pero se detectaron diferencias significativas entre individuos de 9.75 y 15.09 g, rango que está ligeramente fuera de lo reportado por Smith et al. (1985). Fenucci et al. (1982) también determinaron que no había diferencias significativas en los valores de DAPC de individuos de la misma especie con peso corporal entre 7 y 14 g. Las diferencias en la DAPC encontradas en el presente estudio son similares a las reportadas para *L. setiferus* (Fenucci et al., 1982) y sugieren que *L. vannamei* utiliza la proteína más eficientemente en tallas menores a 9.75 g.

Las diferencias significativas en DAPC pueden atribuirse a una mayor sensibilidad estadística con base en la pequeña desviación estándar entre réplicas, ya que la diferencia numérica entre la DAPC de las distintas clases de talla fue de solamente 2.59% (87.79%-90.38%). En virtud de que todos los camarones utilizados en el presente estudio pertenecían a la misma cohorte, no es probable que dichas diferencias hayan sido inducidas genéticamente. Sin embargo, los organismos de las clases de talla 13.14 y 15.09 g habían sido alimentados con dietas que contenían óxido crómico durante 4 y 5 semanas, respectivamente. Divakaran (2005) sugirió que el cromo contenido en el óxido crómico podría ser absorbido por los camarones, de modo que es posible que los valores más bajos de DAPC encontrados en el presente estudio fueran causados por dicho elemento afectando el tracto digestivo ya sea como irritante o como un tóxico suave. De cualquier modo, esto no explicaría la ausencia de diferencias significativas en los datos de DAMS y DAE, pues dichos valores hubieran sido afectados equivalentemente por cualquier factor que interfiera con la digestión.

Digestibilidad aparente de materia seca

La digestibilidad aparente de materia seca representa una buena estimación del grado en que un ingrediente es digerido y absorbido por el tracto digestivo. Los valores de DAMS oscilaron entre 41.8 y 96.8% y fueron más altos para los ingredientes purificados. No existieron diferencias significativas entre los valores de DAMS de ingredientes purificados ya sea con alto contenido de proteína o con alto contenido de carbohidratos, lo que sugiere que *L. vannamei* puede utilizar ambos nutrientes con una misma eficiencia en tanto sean suministrados en niveles razonables. Las diferencias en los valores de DAMS reportadas por Akiyama et al. (1989) entre dietas con alto contenido de proteína y alto contenido de carbohidratos pudieron haber sido causados por la comparación entre dietas

con alto contenido proteico con dietas con alto contenido de almidón de maíz, pues este ingrediente tiene un bajo coeficiente de digestibilidad aparente (Davis *et al.*, 1993; Tablas 4 y 5). El valor de DAMS para el almidón de trigo en el presente estudio fue superado solamente por el de la gelatina y es mayor que el de todos los valores reportados por Akiyama *et al.* (1989), esto nos indica que el almidón de trigo es utilizado rápidamente por *L. vannamei* como fuente de energía. Los ingredientes purificados tuvieron los más altos valores de DAMS en el presente estudio (Tablas 4 y 5), lo que concuerda con reportes donde se ha encontrado no solamente valores de DAMS consistentemente altos para este tipo de ingredientes, sino también de DAE y DAPC (*L. vannamei*: Akiyama *et al.*, 1989; *P. monodon*: Shiau *et al.*, 1992; *Palaemon serratus*: Forster and Gabbott, 1971; *Pandalus platyceros*: Forster and Gabbott, 1971; *Procambarus clarkia*: Brown *et al.*, 1986). Debido a su costo, estos ingredientes no son utilizados normalmente en alimentos balanceados comerciales, pero son utilizados en dietas de investigación purificadas o semi-purificadas. La consistencia en la digestibilidad aparente para las diversas especies de camarones peneidos podría permitir la elaboración de una dieta de digestibilidad de referencia universal, lo que permitiría una mejor comparación de datos entre distintas especies, así como una menor variabilidad entre distintos estudios para una misma especie.

Las diferencias observadas entre los valores de DAMS para las harinas de pescado pueden atribuirse a la correlación negativa entre la DAMS y el contenido de ceniza. Esta correlación coloca a la harina de pescado como uno de los pocos ingredientes que pueden ser evaluados inicialmente para DAMS mediante una medida obtenida fácilmente. Por su parte, las diferencias en el contenido de ceniza de las distintas harinas de pescado no pueden atribuirse a diferencias interespecíficas, ya que no se conoce cómo fueron procesadas las muestras. Generalmente, las harinas obtenidas de pescado entero tienen menor contenido de ceniza, en comparación con las harinas elaboradas después de que se han retirado los filetes (Anderson *et al.*, 1993). A pesar de estas diferencias potenciales en el procesamiento, los valores de DAMS obtenidas para la harina de pescado Menhaden concuerdan con aquellos obtenidos previamente para *L. vannamei* (Akiyama *et al.*, 1989) y *L. setiferus* (Brunson *et al.*, 1997).

Los valores de DAMS de la harina de soya aumentaron conforme se incrementó el refinamiento y contenido proteico de los ingredientes, de 63% para harina de soya integral a 78.7% para la harina de soya aislada 90%. Akiyama *et al.* (1989) reportaron incrementos similares, de 55.9% para harina de soya a 84.1% para aislado de soya suministrado a *L. vannamei*. Este incremento puede deberse a la proteína altamente digerible de estos ingredientes y sugiere que la fracción lipídica se digiere pobremente en la harina de soya integral y en la harina de soya 48% extraída con solvente. La pobre utilización de la fracción lipídica puede deberse al alto contenido de grasa de las dietas de prueba (>10%), ya que se ha demostrado que *L. vannamei* no puede utilizar eficazmente niveles de grasa por arriba de 10% (Dokken, 1987).

Los valores de DAMS de la harina de calamar también se incrementaron conforme se incrementó el grado de refinamiento de los ingredientes, de 61.9-68.6% para el calamar entero a 69.8-74.7% para la harina de músculo. Este incremento puede atribuirse a un mayor contenido de proteína en la harina de músculo, la cual es altamente digerible. Las diferencias significativas encontradas entre las dos harinas de kril pueden deberse a diferencias en el tamaño de partícula, de manera que para una de las harinas pudo haber mayor área superficial para la acción digestiva de las enzimas. Sin embargo, estas harinas fueron obtenidas de fuentes distintas y por tanto pudieran tener otras diferencias en composición que tal vez afectaron las determinaciones de DAMS.

Digestibilidad aparente de proteína cruda

Los coeficientes de DAPC del presente estudio concuerdan muy favorablemente con los reportados anteriormente para esta misma especie utilizando ingredientes individuales (Akiyama *et al.*, 1989). La falta de diferencias entre los estudios sugiere que los coeficientes de DAPC son afectados mínimamente por la asociación de nutrientes (presente estudio) o por el consumo de dietas nutricionalmente incompletas (Akiyama *et al.*, 1989), en tanto se sigan los métodos experimentales respectivos. Las mínimas diferencias pueden también deberse al mismo método de extrusión (en frío utilizando una mezcladora de alimentos Hobart), pues se ha señalado que la técnica de extrusión puede afectar los coeficientes de digestibilidad aparente (Davis y Arnold, 1995). Por otra parte, las diferencias en digestibilidad aparente atribuidas al proceso de extrusión no son universales para todos los ingredientes (Davis y Arnold, 1995), lo que sugiere la importancia de utilizar un método de extrusión de referencia para permitir la comparación entre distintos estudios.

Los ingredientes purificados tuvieron los coeficientes de DAMS y DAPC más altos y los contenidos de ceniza más bajos de todos los ingredientes analizados. Si bien estos ingredientes son altamente digeribles, su perfil de aminoácidos no está bien balanceado. El gluten de trigo tiene un bajo contenido de lisina y ha sido utilizado para determinar el requerimiento de lisina de *L. vannamei* (Fox *et al.*, 1995). Los ingredientes purificados con alto contenido de caseína y gelatina han producido respuestas de crecimiento menores que las observadas típicamente al utilizar harinas prácticas ya sean de origen animal o vegetal (D'Abramo y Castell, 1997). Estas deficiencias, en combinación con su alto costo, han limitado su utilización en dietas de investigación purificadas o semi-purificadas, a las cuales tendría que agregarse un suplemento de alto costo (aminoácidos en forma cristalina) para producir dietas nutricionalmente adecuadas.

Como grupo, los coeficientes de DAPC de las harinas de pescado fueron más altos que los de todas las demás clasificaciones de ingredientes, con excepción de los ingredientes purificados. Los altos valores de DAPC de las harinas de pescado, en conjunto con su bien balanceado perfil de aminoácidos, pone de manifiesto su importancia en la formulación de alimentos y ayuda a explicar por qué la sustitución de la harina de pescado por harinas o subproductos de origen animal no siempre es exitosa. Las diferencias significativas en la

digestibilidad de los diferentes lotes de harina de pescado Menhaden, indican la importancia de la monitorización lote por lote de la digestibilidad de materias primas. El alto contenido de ceniza de la harina con bajo coeficiente de DAPC sugiere un alto contenido de huesos y escamas, el cual es indicativo del uso de material de baja calidad después de haber retirado los filetes del pez. Las diferencias en el contenido de ceniza pueden detectarse rutinariamente en los ingredientes, pero esta monitorización no permitirá detectar diferencias en digestibilidad aparente causadas por tratamiento térmico excesivo, frescura de los ingredientes o diferencias en el proceso de secado (Anderson *et al.*, 1993). Las diferencias en la digestibilidad aparente entre lotes de ingredientes son comunes (Lemos *et al.*, 2000) y pueden ocasionar errores en la formulación que pueden reducir el crecimiento de los organismos. Las diferencias en la DAPC de las harinas de pescado también pueden atribuirse a diferencias en la composición química causadas por el procesamiento (i.e., cantidad de lípido en la harina) o a diferencias interespecíficas (Anderson *et al.*, 1993). A pesar de todos estos factores potenciales, los coeficientes de DAPC del presente estudio concordaron bien con los reportados anteriormente para *L. vannamei* (Akiyama *et al.*, 1989), *Procambarus clarkia* (Reigh *et al.*, 1990) y *L. setiferus* (Brunson *et al.*, 1997).

La proteína de las harinas de soya (48% solvente extraído y aislada 90%) fue significativamente más digerible que la de las harinas de pescado, las de origen animal y las de origen marino analizadas. De forma similar, Ezquerro *et al.* (1997) determinaron una mayor digestibilidad de proteínas de origen vegetal que de origen animal utilizando un método *in vitro* de DAPC, en tanto que Smith *et al.* (1985) no reportaron diferencias en DAPC para proteínas de origen vegetal y animal suministradas a *L. vannamei*. Estos resultados se contraponen a los coeficientes de DAPC significativamente más bajos de harinas de origen vegetal, en comparación con harinas de pescado, harinas de origen animal y de origen marino encontrados para *P. serratus* (Forster y Gabbot, 1971), *P. platyceros* (Forster y Gabbot, 1971) y *L. stylirostris* (Fenucci *et al.*, 1982) e indican la naturaleza omnívora de *L. vannamei*. Dichos resultados sugieren también la importancia que la proteína de origen vegetal puede tener en el reemplazo de la harina de pescado de la dieta de *L. vannamei*. Sin embargo, un alto coeficiente de DAPC por si solo no puede predecir las propiedades de los ingredientes para promover el crecimiento, pues típicamente la proteína de origen vegetal es deficiente en aminoácidos esenciales como lisina y metionina. Para lograr la substitución efectiva de las costosas harinas de pescado con harinas de origen vegetal de bajo costo, además de los coeficientes de DAPC, será necesario también determinar la digestibilidad aparente de aminoácidos y combinar esta información.

Como se indicó anteriormente, el contenido de ceniza estuvo inversamente correlacionado con el contenido de proteína, pero no se halló una correlación similar entre el contenido de ceniza y la DAPC. La harina de gluten de maíz tuvo el segundo más bajo contenido de ceniza y tuvo el más bajo valor de DAPC. Estos resultados muestran la dificultad que existe al tratar de predecir los coeficientes de digestibilidad aparente incluso para

ingredientes de origen vegetal que típicamente tienen una mayor consistencia en su composición entre lotes que las harinas de pescado o de origen animal o marino.

Un alto contenido de ceniza puede afectar el coeficiente de digestibilidad aparente, pero la digestibilidad también puede ser afectada por el procesamiento y por factores anti-nutricionales tales como taninos, ácido fítico y oligosacáridos.

Las harinas prácticas de origen animal generalmente tienen un alto contenido proteico y un perfil de aminoácidos bien balanceado. No obstante, comúnmente existe una inconsistencia en su calidad de un lote a otro, debido a diferencias en el procesamiento y en la calidad de la materia prima. Por tanto, es difícil determinar si los bajos coeficientes de DAPC obtenidos para estos ingredientes se debe a la naturaleza propia de la proteína de origen terrestre o a que la calidad de los ingredientes de estos subproductos, que son obtenidos tras el sacrificio de pollos y reses, era baja. Las diferencias en los valores de DAPC de las harinas de sangre pueden deberse a diferencias en la temperatura del procesamiento, pues la harina de sangre secada en spray implica el uso de una menor temperatura de procesamiento en comparación con la de la harina de sangre convencional. La alta temperatura utilizada en el procesamiento puede dañar los aminoácidos (i.e., reacción de Maillard, degradación oxidativa, etc.), haciéndolos no disponibles para los animales. El alto contenido de proteína de la harina de sangre (> 97%) la hace especialmente sensible al calor, lo que puede conducir a reducciones significativas en la digestibilidad aparente de la proteína (Cho *et al.*, 1982).

Es interesante que, a pesar de ser utilizadas comercialmente en alimentos balanceados para camarones peneidos, no se habían reportado anteriormente coeficientes de DAPC para las harinas de kril y de calamar. La proteína de origen marino de estos productos tuvo coeficientes de DAPC estadísticamente equivalentes al de las harinas de pescado con los más altos valores de DAPC. El uso de estos ingredientes en los alimentos balanceados comerciales demuestra que son los datos de crecimiento, y no los coeficientes de digestibilidad, los que se utilizan para formular alimentos. El valor de DAPC de la harina de cangrejo fue más alto que los reportados anteriormente para *L. setiferus* (Brunson *et al.*, 1997) y *Procambarus clarkia* (Reigh *et al.*, 1990); sin embargo, este coeficiente debe interpretarse con cautela, ya que el alto contenido de quitina de este ingrediente será incluido como parte de la proteína, sobreestimando su verdadero contenido proteico. De forma similar, el coeficiente de DAPC de la harina de hígado de calamar debe ser interpretado con cuidado, puesto que este ingrediente es mezclado típicamente con proteína de soya (que es altamente digerible) o con proteína de papa (poco digerible), lo que determinará la digestibilidad global del ingrediente y lo cual también explica las grandes diferencias existentes entre los valores de DAPC encontrados en el presente estudio y los reportados para *Penaeus monodon* (Merican y Shim, 1995).

Los coeficientes de DAPC obtenidos en el presente estudio probablemente no sean aplicables completamente a otras especies de camarones debido a diferencias interespecíficas en cuanto a la digestión de proteína (Lemos *et al.*, 2000), pero pueden utilizarse como una estimación, especialmente en casos donde datos para una especie en particular aún no estén disponibles.

Digestibilidad aparente de energía

Los ingredientes purificados tuvieron los más altos coeficientes de DAE entre todas las clasificaciones de ingredientes. El coeficiente de DAE obtenido en este estudio para el gluten de trigo (99.5%) fue numéricamente menor al obtenido para *L. setiferus* (106%, Brunson *et al.*, 1997). Sin embargo, es necesario considerar que el coeficiente de DAE para el gluten de trigo se redujo a 99.5% en el presente estudio después de ser recalculado utilizando la fórmula sugerida por Bureau y Hua (2006), la cual toma en cuenta los errores matemáticos en el cálculo descrito por Cho *et al.* (1982). De este modo, el valor aquí obtenido es similar al reportado por Brunson *et al.* (1997).

Los altos coeficientes de DAMS (92.3%) y DAE (98.9%) del almidón de trigo encontrados en el presente estudio ayudan a explicar por qué este ingrediente puede reemplazar a la proteína sin provocar un decremento en el crecimiento (Cruz-Suarez *et al.*, 1994) y también por qué *L. vannamei* puede utilizar eficientemente altos niveles del mismo, de acuerdo con lo observado por Cousin (1995). No obstante, Davis *et al.* (1993) reportaron valores de DAMS (51%) y DAE (71%) de almidón de trigo comparativamente bajos para *L. vannamei*. Ya que ambos estudios utilizaron los mismos métodos experimentales e incluso el mismo método de extrusión de alimento, estas diferencias ilustran cómo los coeficientes de digestibilidad de ingredientes pueden variar en función de las condiciones ambientales y fisiológicas bajo las cuales se hacen las mediciones. Los efectos de estos factores sobre la digestión de carbohidratos fueron determinados por Gaxiola *et al.* (2005), quienes reportaron que la actividad específica de la hexoquinasa IV de *L. vannamei* era afectada por efectos sinérgicos de los carbohidratos dietéticos, la salinidad y la fase del ciclo de muda. Estas complejidades e interacciones en la digestión de *L. vannamei* hacen casi imposible obtener un valor absoluto de digestibilidad, pero aún así, los coeficientes de digestibilidad aparente permiten la determinación de un intervalo definido para cada ingrediente y proveen de una medida valiosa para formular dietas de bajo costo y amigables con el ambiente.

Los valores de DAE de la harina de pescado fueron consistentemente altos, siendo superiores a los de todas las demás clasificaciones de ingredientes, con excepción de los ingredientes purificados. Los altos valores de DAE sugieren que las fracciones lipídicas, las cuales son una fuente excelente de ácidos grasos esenciales, contenidas en las harinas fueron muy bien digeridas, aún cuando los niveles de lípido excedieron 10% para muchas de ellas. Esta alta digestibilidad también ayuda a explicar la razón por la que reemplazar las harinas de pescado con harinas de soya (solvente extraído), que aparentemente tuvieron una baja digestibilidad de su fracción lipídica en este estudio, no siempre producen un crecimiento equivalente en *L. vannamei* (Lim y Dominy, 1990).

El bajo valor de DAE del gluten de trigo fue un tanto sorprendente, tomando en cuenta que Davis y Arnold (1995) reportaron un incremento en los valores de DAE de ingredientes que han sido sometidos a un mayor procesamiento. De cualquier modo, dicho valor es mayor al obtenido para maíz quebrado cocido con vapor (Davis y Arnold, 1993). Entre los diversos ingredientes analizados por estos autores, el maíz quebrado cocido con

vapor tuvo los valores más bajos de DAMS y DAE. Algunos productos de maíz sometidos a procesos de extrusión han tenido valores altos de DAE; sin embargo, este efecto es atribuido a la mayor gelatinización causada por dicho proceso (Davis y Arnold, 1995). Se han obtenido coeficientes altos de DAE de maíz cocido para *Procambarus clarkii* (Brown *et al.*, 1989) y *Macrobrachium rosenbergii* (Law *et al.*, 1990), pero no existen valores de DAE de productos de maíz crudos obtenidos con estas especies para fines comparativos. Los coeficientes de DAE de las harinas de cangrejo fueron mucho mayores que los reportados para *L. setiferus* y sugieren que *L. vannamei* tiene una actividad de quitinasa mucho mayor. Las quitinasas permiten la digestión de exoesqueletos quitinosos, que representan la mayor parte de la ceniza en la harina de cangrejo. Se ha demostrado que *L. vannamei* puede digerir la quitina efectivamente (Lee y Lawrence, 1982). En contraste, aunque *L. setiferus* también posee actividad quitinasa, su capacidad de digestión está limitada a 25% de la quitina disponible cuando su nivel dietético excede 40 g kg⁻¹ (Clark *et al.*, 1993).

La DAE estuvo correlacionada con la DAPC, lo que no es sorprendente si se considera que la mayor parte de la energía de los ingredientes analizados proviene precisamente de la proteína. Es necesario analizar un número adicional de ingredientes cuya energía esté compuesta principalmente de carbohidratos, con lo cual se podría evaluar la capacidad de *L. vannamei* para utilizar esta fuente de energía. Es desafortunado que no existan reportes en estudios previos de los coeficientes de DAE de los ingredientes aquí analizados, ya sea para *L. vannamei* u otras especies de camarones peneidos, lo que no permite una comparación directa.

Experimentos in vitro

Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda

Existió una correlación positiva ($r = 0.55$; $P < 0.05$) entre los coeficientes de DAPC *in vivo* y los obtenidos *in vitro* utilizando 0.0002% de pepsina. Estos resultados preliminares son promisorios ya que las determinaciones *in vitro* son rápidas, de menor costo y pueden realizarse en sitios donde no hay condiciones adecuadas para trabajo *in vivo*. El valor de r obtenido en este estudio es el mismo que el obtenido mediante el método de decremento del pH ($r^2 = 0.55$), pero menor al observado con el método pH-stat ($r^2 = 0.73$ a 0.80 ; Ezquerro *et al.*, 1998). Al utilizar 0.0002% de pepsina se tendió a subestimar la digestibilidad de las muestras con alto contenido de ceniza y a sobreestimar la de muestras digeridas pobremente, lo que también fue observado por Ezquerro *et al.* (1998) al analizar muestras mediante el método de decremento del pH. La falta de una correlación al utilizar 0.2% de pepsina puede considerarse normal, pues *L. vannamei* no posee esta enzima en su tracto digestivo (Lee y Lawrence, 1982). Aunque estos datos preliminares indican que se pueden utilizar concentraciones diluidas de pepsina para lograr estimaciones de digestibilidad aproximadas a coeficientes obtenidos *in vivo*, Lemos (2003) reportó que la estimación de la digestibilidad utilizando pepsina no es aplicable a dietas preparadas e ingredientes de origen vegetal. Sin duda, se requiere de mucho mayor investigación científica antes de que estos resultados puedan utilizarse para complementar los

bioensayos de digestibilidad *in vivo* con *L. vannamei*. Los resultados de digestibilidad *in vitro* podrían reemplazar a los trabajos *in vivo* solamente si son capaces de predecir la compleja naturaleza de la digestión de los camarones, la que se ha demostrado que está modulada por los componentes del alimento, produciendo de 10 a 44% de diferencias en los coeficientes de digestibilidad con respecto a un tratamiento control (Cordova-Murueta y Garcia-Carreno, 2002). A pesar de haber tenido mejorías significativas, los métodos de digestibilidad *in vitro* aún no parecen poder reemplazar a los bioensayos de digestibilidad *in vivo*, especialmente cuando se busca determinar más que la digestibilidad aparente de proteína.

Referencias

- Akiyama, D.M., Coelho, S.R., Lawrence, A.L., Robinson, E.H., 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 91-98.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A., 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: Fast, A.W., Lester, J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, pp. 535-567.
- Anderson, S.J., Lall, S.P., Anderson, D.M., McNiven, M.A., 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. *Aquaculture* 115, 305-325.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Vol. 1. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA
- Brown, P.B., Williams, C.D., Robinson, E.H., 1986. Evaluation of methods for determining digestion coefficients for adult red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of the World Aquaculture Society* 17, 19-24.
- Brown, P.B., Robinson, E.H., Clark, A.E., Lawrence, A.L., 1989. Apparent digestible energy coefficients and associative effects in practical diets for red swamp crayfish. *Journal of the World Aquaculture Society* 20, 122-126.
- Brunson, R.P., Romaine, R.P., Reigh, R.C., 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture Nutrition* 3, 9-16.
- Bureau, D.P., Hua, K., 2006. Letter to the Editor of *Aquaculture*. *Aquaculture* 252, 103-105.
- Chen, J.C., Lin, C.Y., 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C, 477-482.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J., Bayley, H.S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73B, 25-41.
- Clark, D.J., Lawrence, A.L., Swakon, D.H.D., 1993. Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. *Aquaculture* 109, 51-57.
- Cordova-Murueta, J.H., Garcia-Carreno, F.L., 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210 371-384.
- Cousin, M., 1995. Etude de l'utilisation des glucides et du rapport protéines-énergie chez les deux espèces de crevettes pénéides, *Penaeus vannamei* et *Penaeus stylirostris*. These, INRA Paris Grignon.
- Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Pinal-Mansilla, J.D., Wesche-Ebellling, P., 1994. Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture* 123, 349-360.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513-551.
- D'Abramo, L.R., Castell, D., 1997. Research Methodology. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.E. (Eds.), *Crustacean Nutrition*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 3-20.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *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., McCallum, I., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 8, 87-94.
- Divakaran, S., 2005. Chromic oxide: The inert marker for *in vivo* digestibility studies in shrimp, problems and solutions. *Aqua Feeds: Formulation and Beyond* 2, 28-29.
- Dokken, Q.R., 1987. Effects of varying dietary macronutrient and energy rations on growth and survival of *Penaeus vannamei* and *Penaeus setiferus*. Ph.D. Dissertation, Texas A&M University, College Station, TX, 80 pp.
- Ezquerria, J.M., Garcia-Carreño, F.L., Civera, R., Haard, N.F., 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157, 251-262.
- Ezquerria, J.M., Garcia-Carreño, F.L., Carrillo, O., 1998. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 163, 123-136.
- Fenucci, J.L., Fenucci, A.C., Lawrence, A.L., Zein-Elden, Z.P., 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp, *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Mariculture Society* 13, 134-145.
- Forster, J.R.M., Gabbot, P.A., 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 943-961.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L., Chan, E.L., 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* 131, 279-290.
- Garcia-Carreño, F.L., 1998. Prediction of protein digestibility in shrimp and use of second generation protein ingredients in aquaculture feeds. In: IV International Symposium Nutrition in Aquaculture. La Paz, BCS, Mexico, November 15-18. CIBNOR, La Paz, BCS, Mexico, Conference.
- Gaxiola, G., Cuzon, G., Garcia, T., Taboada, G., Brito, R., Chimal, M.E., Paredes, A., Soto, L., Rosas, C., Wormhoudt, A., 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140, 29-39.
- Law, A.T., Chin, K.S.S., Ang, K.J., Kamarudin, M.S., 1990. Digestibility of low cost ingredients in pelleted feeds by *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). In: Hirano R., Hanyu, I., (Eds.), *The Second Asian Fisheries Forum*. The Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. Pp. 333-3336.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp, influences of diet, age and species. *Physiologist* 25, 241.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. In: D'Abramo, L/R/, Conklin, D.E., Akiyama, D.E. (Eds.), *Crustacean Nutrition*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 194-260.
- Lemos, D., Ezquerria, J.M., Garcia-Carreño, F.L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture* 186, 89-105.
- Lemos, D., 2003. *In vitro* determination of protein digestibility with enzymes from the target species. *International Aqua Feed* 6, 40-42.
- Lim, C., Dominy, W., 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 87, 53-64.
- McGinnis, A.J., Kasting, R., 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide used to study food utilization by phytophagous insects. *Agricultural and Food Chemistry* 12, 259-262.
- Merican, Z.O., Shim, K.F., 1995. Apparent digestibility of lipid and fatty acids in residual lipids of meals by *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 133, 275-286.
- Mullen, J.D., Riley, J.P., 1955. The spectrophotometric determination of nitrite in natural waters, with particular reference to sea-water. *Anal. Chim. Acta.*, 12, 464-480.
- Pond, W.G., Church, D.C., Pond, K.R., 1995. *Basic animal nutrition and feeding*, 4th edn. John Wiley and Sons Inc., New York. 615 pp.
- Reigh, R.C., Branden, S.L., Craig, R.J., 1990. Apparent digestibility coefficients for common feedstuffs in formulated diets for red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquaculture* 84, 321-334.
- Sarac, Z., Thaggard, H., Saunders, J., Gravel, M., Neill, A., Cowan, R.T., 1993. Observations on the chemical composition of some commercial prawn feeds and associated growth responses in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 115, 97-110.

- Shiau, S.Y., Lin, K.P., Chiou, C.L., 1992. Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and in sea water. *Journal of Applied Aquaculture* 1, 47-53.
- Smith, L.L., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Strawn, K., 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 46, 85-96.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2004. Accurate measurement of *in vivo* digestibility of shrimp feeds. *Aquaculture* 232, 563-580.
- Solarzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography* 14, 799-801.
- Spotte, S., 1979a. Fish and invertebrate culture: water management in closed systems, 2nd ed. Wiley, New York, pp. 179.
- Spotte, S., 1979b. Seawater aquariums: the captive environment. Wiley, New York, pp. 413.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd ed. Bull. 167, Fish. Res. Board Can., Ottawa, pp. 310.
- Velasco, M., Lawrence, A.L., Neill, W.H., 1999. Efectos de la proteina y el fósforo dietario en la calidad de agua de acuicultura. In: Cruz, L.E., Mendoza, R.E., Ricque, D. (Eds.), *Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, pp. 597-612.