

Uso de Harina de Subproductos Avícolas en Alimentos para *L. Vannamei*

Dra. L. Elizabeth Cruz-Suárez, Dra. Martha Nieto-López, Dr. Denis Ricque-Marie, QBP Claudio Guajardo-Barbosa y Msc. Ulrike Scholz

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Programa Maricultura, Ciudad Universitaria A.P. F-56, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México.
Tel+fax: +52 81 83 52 63 80; E-mail: lucruz@fcb.uanl.mx

Resumen

Se evaluó el uso de harina avícola grado mascota (66% proteína cruda) como sustituto de una mezcla 50/50 de harinas de pescado estadounidense (menhaden) y mexicana (65% proteína cruda) en un alimento tipo comercial conteniendo 35% de proteína cruda y 8-9% de lípidos. Los niveles de reemplazo evaluados fueron 0, 35, 50, 65 y 80%, con niveles de inclusión de 0, 13.7, 19.6, 25.5 y 31.4% en el alimento. Dos alimentos peletizados comerciales producidos en México, con 30 y 35% de proteína, fueron utilizados como controles externos. Estos alimentos fueron suministrados a camarones *L. vannamei* (450 mg peso inicial) durante 4 semanas. Cada tratamiento fue evaluado en términos de crecimiento, consumo, tasa de conversión alimenticia (TCA), sobrevivencia, tasa de eficiencia proteica (PER) y tasa neta de utilización proteica (NPU), con 4 repeticiones, en acuarios con 10 camarones cada uno. Adicionalmente se determinó la digestibilidad aparente (materia seca, proteína y energía) de cada alimento y la digestibilidad de la harina avícola y de la mezcla de harinas de pescado, utilizando el método de óxido de cromo y camarones *L. vannamei* (1.6-2g). Bajo las condiciones experimentales usadas en este estudio, ninguno de los parámetros evaluados en los camarones experimentales fue afectado significativamente con el 35 y 50% de reemplazo de la harina de pescado. A 65 y 80% de reemplazo algunos parámetros como consumo y crecimiento empezaron a disminuir significativamente. La digestibilidad de todos los alimentos fue excelente, superior al 80%. Las digestibilidades de la proteína, de la materia seca y de la energía de la harina avícola (90.4, 90.8 y 97.6%) fueron mayores que las de la mezcla de harinas de pescado (87.9, 81.4 y 83.3%). Los alimentos comerciales usados como control externo sin harina avícola, presentaron resultados de crecimiento y digestibilidad iguales o menores a los de los alimentos experimentales. La harina avícola grado mascota es un ingrediente adecuado para sustituir la mezcla de harinas de pescado hasta en un 50% en fórmulas de tipo comercial para camarón blanco.

Introducción

La harina de pescado es un ingrediente que por sus conocidas propiedades nutricionales es utilizado sistemáticamente en alimentos comerciales para engorda de camarón en todo el mundo. Sin embargo, es un ingrediente que no siempre está disponible lo que repercute a su vez en su precio y representa una de las principales preocupaciones de los compradores de materias primas en las plantas de alimentos. De ahí que en los últimos años una gran parte de la investigación aplicada en nutrición acuícola se haya enfocando a la búsqueda de proteínas alternativas a la harina de pescado. Las harinas de subproductos y en general los productos de reducción de rastro, históricamente han sido identificados como productos con un alta variabilidad en su composición

química, con elevados niveles de ceniza, baja digestibilidad y altos contenidos de grasas saturadas que no son adecuados para alimentos acuícolas. Sin embargo, actualmente se producen harinas animales con materias primas seleccionadas de buena calidad, usando procesos tecnológicos modernos que permiten generar productos de calidad constante con buena digestibilidad. Existen varios estudios publicados de reemplazo de harina de pescado con harinas avícolas en alimentos para diferentes especies de camarón, los estudios más recientes en *L. vannamei* son los de Davis *et al.* (2000) y Samocha *et al.* (2004) donde evalúan el uso de coextruidos de soya-harina de subproductos de pollo y harina de subproductos de pollo secada por flash-dry, reemplazando harina de pescado menhaden en fórmulas con 32% de proteína cruda y 8% de lípidos. Los parámetros de rendimiento evaluados fueron mejorados o no fueron significativamente afectados por el reemplazo de hasta el 80 y 100% de la harina de menhaden. Otros estudios han sido realizados en China sobre la misma especie pero utilizando fórmulas con 40% de proteína obteniendo resultados similares, sin embargo el exceso de proteína usado en esos estudios podría ser objetable.

El objetivo del presente estudio fue evaluar en términos de rendimiento y digestibilidad una harina de subproductos avícolas - grado mascota (HSA-GM) en alimentos prácticos para camarón blanco, reemplazando en 4 niveles una mezcla de harina de pescado mexicana y de harina de menhaden estadounidense, en fórmulas con 35% de proteína, usando como controles externos 2 alimentos comerciales peletizados producidos en México.

Material y método

La harina de subproductos avícolas grado mascota (HSA-GM) fue proporcionada por la compañía Griffin Industries Inc., Bastrop, Texas (junio 2004). Las especificaciones técnicas del producto se presentan en un archivo anexo (Premium Pro Poultry Protein.doc). Las harinas de pescado utilizadas fueron una harina de pescado mexicana de Sonora y una harina estadounidense de menhaden. La mezcla 50/50 de estas harinas y la harina avícola fueron analizadas en el laboratorio de análisis químicos del Programa Maricultura de la UANL en su composición proximal (ver métodos en la sección de análisis de alimentos), contenido de proteína soluble,

colesterol (Courchaine *et al.*, 1959), de fosfolípidos (AOCS Ja-4-46, 1989), y los resultados se presentan en la tabla 2 (ver sección resultados).

Una dieta de base, conteniendo la mezcla de harinas de pescado, harina de crustáceos y la pasta de soya como principales fuentes de proteína, fue formulada para cubrir los requerimientos nutricionales del camarón con 35% de proteína cruda y 8-9% de lípidos (tabla 1). Las dietas experimentales fueron desarrolladas a partir de esta formula de base reemplazando la mezcla de harinas de pescado, a niveles de 35, 50, 65 y 80%, peso por peso, con HSA-GM. El aporte de fosfolípidos de la HSA fue considerado ajustando el nivel de lecitina y de aceite de pescado en los alimentos. No se compenso ningún otro nutriente por el reemplazo en las formulas. A todos los alimentos se les agrego 1% de oxido de cromo como marcador para el estudio de su digestibilidad. Adicionalmente se prepararon 2 alimentos de referencia para determinar la digestibilidad de la mezcla de harinas de pescado y de la HSA. Estos alimentos fueron elaborados con la formula del alimento de base, pero quitando la harina de pescado y llevando el resto de los ingredientes al 100% manteniendo las mismas proporciones y con el alimento 5, quitando toda la HSA (tabla 1). Para el bioensayo de crecimiento se evaluaron además como controles externos 2 alimentos comerciales (A y B) producidos por compañías de alimentos en México.

Los alimentos fueron preparados en laboratorio con un molino de carne y un dado de 1.6 mm, después de pesar, mezclar todos los ingredientes y agregar aproximadamente 30% de agua. Posteriormente los “pellets” (en forma de spaghetti) fueron secados durante 8 min a 100C en un horno de convección.

Tabla 1.- Formulas de la dietas prueba y de las dietas de referencia (g / kg)

Dieta	1	2	3	4	5	Ref 1 (HP) referencia	Ref 2 (HSA) referencia
Nivel de reemplazo	0%	35%	50%	65%	80%		
HSA-GM	0.00	137.2	196.1	254.9	313.7	---	---
Mezcla de HP	392.1	254.9	196.1	137.2	78.4	---	114.6
Trigo	445.4	450.6	451.4	452.4	453.6	725.3	652.6
Harina de crustáceos	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	61.9	54.8
Harina de kelp	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	59.4	52.6
Pasta de soya	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	49.5	43.8
Lecitina	35.0	29.7	29.1	28.4	27.8	57.8	40.5
Aceite de pescado	18.4	18.5	18.3	18.0	17.5	30.4	25.6
Otros*	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
Cr ₂ O ₃	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

* Mezcla vitaminas 2.5, mezcla mineral 2, antioxidante 3, antifungico 0.3, Vit C 0.5 g/kg.

Análisis bromatológico y lixiviación de alimentos

La composición bromatológica de los alimentos fue determinada de la siguiente manera: humedad (AOAC, 1990, método #920.36), proteína cruda (Tecator, 1987), lípidos Soxhlet (Tecator, 1983), ceniza (AOAC, 1990, método #942.05) y fibra (AOAC, 1990, método #962.09). El extracto libre de nitrógeno fue calculado por diferencia. Se determino la lixiviación de las dietas (pérdida de materia seca y proteína) después de una hora de inmersión en agua marina a 28°C y 35 g L⁻¹ (3 replicados por dieta) por el método Smith (2000) y Kjeldhal (Tecator, 1987) respectivamente. La pérdida de materia seca (PMS %) y proteína (PP %) en las dietas experimentales fue determinada utilizando las siguientes fórmulas:

% PMS = 100 * (Peso del alimento en base seca antes de lixiviar - Peso del alimento en base seca después de lixiviar) / Peso del alimento en base seca antes de lixiviar

% PP = [(% de proteína en el alimento *100) - (% de proteína en el alimento lixiviado * (100- % perdida de materia seca en la dieta))] / % proteína en el alimento.

Se determino el porcentaje de absorción de agua después de sumergir los alimentos en agua destilada por una hora.

Instalaciones para bioensayos marinos y parámetros de calidad de agua

Los bioensayos de crecimiento y digestibilidad se corrieron al mismo tiempo en la sala de bioensayos del programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL en Monterrey N.L., México en un sistema de recirculación con agua marina artificial.

La sala de bioensayos contiene 54 acuarios experimentales de fibra de vidrio de 60L, cada uno alimentado continuamente con agua marina sintética (Fritz, Dallas, TX), cada uno con un doble fondo cubierto de una tela de gasa de color negro y un sistema de recirculación interna del agua ("air-water lift").

Los parámetros de calidad del agua como salinidad (30-24ppt) y temperatura (27-31°C) fueron medidos diariamente, pH (7.8-8.1), $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$ (0-0.5 mg/L), NO_2 (0.25-0.5 mg/L) y NO_3 (20-80mg/L) fueron determinados cada semana. Los parámetros se mantuvieron dentro del óptimo para *L. vannamei* y el sistema de recirculación esta diseñado para que las variaciones afecten todos los acuarios simultáneamente.

Animales experimentales

Aproximadamente 800 *Litopenaeus vannamei* de 450mg y también 400 *L. vannamei* de 1.5g fueron obtenidos de Industrias Pecis, Yucatán y aclimatados a las condiciones de la sala de bioensayos en tanques de 500L antes de comenzar el bioensayo de crecimiento y digestibilidad.

Bioensayo de crecimiento

Diseño experimental

Para el bioensayo de crecimiento de 28 días, se utilizaron 280 juveniles de camarón *L. vannamei*, con un peso promedio inicial de 460 mg. Se distribuyeron 10 animales por acuario en 28 acuarios de 60x30x35cm de fibra de vidrio, pesados individualmente. Los tratamientos fueron asignados al azar en 4 bloques de 4 acuarios (4 replicados) para evaluar cada dieta. Al siguiente día de distribuir

Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., Guajardo-Barbosa, C. y Scholz, U. 2004. Uso de Harina de Subproductos Avícolas en Alimentos para *L. vannamei*. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacinal de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

los animales en los acuarios, los camarones muertos fueron reemplazados y se inicio la alimentación. La mortalidad y los restos de alimento fueron registrados diariamente por la mañana y posteriormente los acuarios se limpiaban de residuos de alimento y heces.

Alimentación y registro del consumo de alimento

Los camarones fueron alimentados a saciedad partiendo con un 10% de la biomasa presente en cada acuario. La tasa de alimentación fue ajustada diariamente hasta encontrar la menor cantidad de restos de alimento cada mañana. Los restos de alimento fueron estimados cada mañana en cada acuario como un porcentaje de la ración administrada el día anterior. El alimento fue distribuido 1 vez al día la primera semana y 2 veces al día el resto del bioensayo, la primera después de limpiar el acuario en las mañanas y la otra en la tarde. Se distribuyo un número de pellets igual o mayor al número de camarones por acuario (rompiendo el pellet en pedacitos cuando fuera necesario).

Parámetros zootécnicos

Peso individual: fue medido a los 0, 14 y 28 días del experimento. Los camarones fueron pesados individualmente en una balanza digital con precisión de un miligramo después de haber sido ligeramente secados en un trapo.

Biomasa del acuario: es la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en un acuario. Esta variable refleja los efectos en conjunto del crecimiento y de la sobrevivencia.

Ganancia en peso individual (%): es el incremento en peso con respecto al peso individual promedio inicial. Esta variable será calculada para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final. Ganancia en peso individual = [(peso individual promedio final - peso individual promedio inicial)/ peso individual promedio inicial] X 100.

Tasa de sobrevivencia: el número final de camarones en cada acuario en porcentaje del número inicial. Tasa de sobrevivencia = (Número final/Número inicial) X 100

Consumo: el consumo individual fue estimado cada día de la cantidad de alimento suministrado en cada acuario, del porcentaje de restos de alimento estimado al día siguiente y del número de camarones presentes ese día en el acuario. Para cada acuario el consumo reportado es la suma del consumo individual diario estimado a lo largo de los 28 días de bioensayo. Consumo individual = \sum_1^{28} (consumo en el acuario al día i/ número de camarones al día i).

Tasa de conversión alimenticia (TCA): es el alimento consumido por unidad de peso ganado. TCA= consumo individual estimado/incremento en peso individual promedio.

Tasa de eficiencia proteica (PER): es el incremento en peso con respecto a la proteína consumida. Esta variable fue calculada para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final, y de los gramos de proteína consumida. PER= (peso individual promedio final - peso individual promedio inicial)/ (consumo individual * concentración proteica en el alimento).

El PER fue también corregido por las pérdidas de proteína después de lixiviación.

Utilización proteica neta (NPU): es el depósito de proteína por camarón con respecto a la proteína ingerida. Esta variable fue calculada para cada acuario a partir del contenido proteico inicial y del contenido proteico final en los camarones. NPU= [(peso individual promedio final*proteína en carcas al final) – (peso individual promedio inicial* proteína en carcas al inicio)] / proteína consumida.

El NPU fue también corregido por las pérdidas de proteína después de lixiviación.

Bioensayo de digestibilidad

Diseño experimental para el bioensayo de digestibilidad

La digestibilidad de la proteína, de la materia seca y energía de los alimentos fue determinada utilizando 4 acuarios replicados con 10 camarones *L. vannamei* (1.6-2 g peso inicial).

Los camarones fueron alimentados 2 veces al día con una ración diaria de 10% de la biomasa y la colecta de heces se inicio después de la aclimatación de los camarones por dos días. Las heces se colectaron después de remover el alimento no consumido a los 90 y 120 minutos después de alimentar, la colecta se llevo a cabo durante 7 días hasta coleccionar 1.5 g de heces por tanque (peso húmedo). La colecta de heces se realizo por sifoneo y fueron lavadas inmediatamente después de coleccionarlas con agua destilada y congeladas.

El contenido de proteína en alimento y heces fue determinado utilizando 30 mg de alimento y/o heces empleando el método Kjeldhal modificado por Nieto *et al.* (1997). Sobre la misma muestra se determino el contenido de óxido de cromo mediante el método calorimétrico de Bolin *et al.* (1952).

Ecuaciones de digestibilidad aparente

La digestibilidad aparente de la proteína de las dietas (DAPD) así como la digestibilidad de la materia seca (DAMSD) se calcularon mediante las siguientes formulas (Maynard y Loosli, 1996):

$$\%DAPD = 100 - 100 * (\%PC \text{ en las heces} / \%Cr \text{ en las heces}) * (\%Cr \text{ en la dieta} / \%PC \text{ en la dieta})$$

$$\%DAMSD = 100 - 100 * (\% Cr \text{ en la dieta} / \% Cr \text{ en las heces})$$

Donde: %Cr y %PC son las concentraciones de cromo y proteína cruda (% en base seca) respectivamente.

En base a la determinación de los porcentajes de lixiviación de la proteína (%PP) y de la materia seca (%PMS) de las dietas antes de la ingestión, análisis bromatológico y lixiviación de los alimentos, se corrigió la digestibilidad aparente de la proteína y de la materia seca de las dietas, aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\%DAPD_{lixcorr} = 100 - 100 * (\% PC_{heces} / \% Cr_{heces}) * (\% Cr_{dieta} / \% PC_{dieta}) * (1 / (1 - (\%PP / 100)))$$

$$\%DAMSD_{lixcorr} = 100 - 100 * (\%Cr_{dieta} / \%Cr_{heces}) * 1 / (1 - \%PMS / 100)$$

La digestibilidad aparente de materia seca, y proteína de los ingredientes (%DAMSI y %DAPI respectivamente) fue determinada utilizando el principio de sustitución desarrollado por Cho & Slinger (1979).

$$\%DAPI = (100 * \%DAPD_{dieta\ exp.} * \%PC_{dieta\ exp.} - (100 - \%IE) * \%DAPD_{dieta\ ref.} * \%PC_{dieta\ ref.}) / (\%IE * \%PC_{IE})$$

$$\%DAMSI = (100 * \%DAMSD_{dieta\ exp.} * \%MS_{dieta\ exp.} - (100 - \%IE) * \%DAMSD_{dieta\ ref.} * \%MS_{dieta\ ref.}) / (\%IE * \%MS_{IE})$$

Donde: %IE es el porcentaje de inclusión del ingrediente experimental en base seca (en % de la materia seca del ingrediente en la mezcla), %MS_{IE}, %PC_{IE} son la concentración de materia seca y proteína cruda en el ingrediente experimental (en % de materia seca).

La digestibilidad aparente de la energía de las dietas (DAED) y los ingredientes (DAEI) fue determinada en una bomba semi-micro calorimétrica (Parr, 1992, No.280 MN) y fue calculada con las siguientes ecuaciones:

$$\%DAED = 100 - 100 * (\%Cr\ en\ dieta / Energía\ en\ dieta) * (Energía\ en\ heces / \%Cr\ in\ heces)$$

$$\%DAEI = (100 * \%DAED_{dieta\ exp.} * E_{dieta\ exp.} - (100 - \%IE) * \%DAED_{dieta\ ref.} * E_{dieta\ ref.}) / (\%IE * E_{IE})$$

Donde: E_{dietaexp}, E_{dieta ref} y E_{IE} son las concentraciones de energía en las dietas e ingredientes (kcal/g).

Análisis estadísticos

El peso individual fue utilizado para la comparación estadística (análisis de varianza, ANOVA) del peso promedio de los replicados en el interior de cada tratamiento en particular, con el fin de

validar los replicados. Una vez validados los replicados, los parámetros por acuario (biomasa final, tasa de crecimiento, sobrevivencia, consumo, TCA, PER y NPU) fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía para establecer diferencias entre los tratamientos evaluados y un análisis múltiple de medias Duncan para separar las medias de los tratamientos.

Los coeficientes de digestibilidad calculados a partir de las diferentes muestras de heces, fueron sujetos a un análisis de varianza de una vía y un análisis múltiple de medias por el método de Duncan para determinar si existían diferencias significativas entre las digestibilidades de las dietas experimentales e ingredientes evaluados.

Resultados

La composición proximal de la HSA y de la mezcla de HP se presenta en la Tabla 2. Se puede observar que los resultados del análisis realizado en el Programa Maricultura coinciden con los datos presentados en la hoja técnica del producto, enviada por Griffin Industries Inc.

Tabla 2.- Composición de HSA-GM y de mezcla de HP (% base húmeda)

	HSA-GM		Mezcla de HP
	Griffin	UANL	
% Humedad	4.50	4.41	4.58
% Proteína	65.00	66.27	65.02
% Lípidos	12.00	12.60	8.95
% Ceniza	13.00	12.02	17.27
% Fibra	2.00	0.97	---
% ELN	3.5	3.7	---
Proteína soluble		18.3	
Colesterol		0.585	
Fosfolípidos		3.7*	

* 30.07 % en la grasa

También se puede observar que la HSA tiene un nivel ligeramente mayor de proteína, mayor de lípidos y menor de ceniza que la mezcla de HP.

La composición proximal de los alimentos, pérdida de materia seca, pérdida de proteína después de una hora de inmersión en agua marina, así como la capacidad de absorción de agua de los pellets se presentan en las tablas 3 y 3b. Se observa que el contenido de proteína es semejante en todos los alimentos $34.6\% \pm 0.25$ por lo que se pueden considerar iso-proteicos, mientras que el contenido de lípidos incremento linealmente con el incremento en el nivel de inclusión de la HSA (media: $9.18\% \pm 0.5$). El contenido de ceniza de los alimentos experimentales bajo con el

aumento en el nivel de reemplazo de 11.8 en la dieta 1 a 10.3% en la dieta 5, mientras que la fibra subió ligeramente (1.8% a 2.87%).

Tabla 3.- Análisis proximal de los alimentos experimentales (% base húmeda), pérdida de material seca y de proteína después de una hora de inmersión en agua, y absorción de agua.

Dieta	1	2	3	4	5	Ref 1 HP	Ref 2 HSA	Probabilidad
% reemplazo	0%	35%	50%	65%	80%	referencia	referencia	ANOVA
Humedad	5.32	4.95	4.41	2.69	4.13	4.80	3.23	
Proteína	34.5	34.2	34.6	35.9	34.6	15.9	21.2	
Lípidos	8.60	8.63	9.51	9.73	9.45	9.07	7.51	
Ceniza	11.8	11.1	10.7	10.4	10.3	7.20	8.40	
Fibra	1.80	2.13	2.90	2.64	2.87	2.86	3.44	
ELN	38.0	38.9	37.9	39.6	38.6	60.2	56.3	
%PMS	8.1a	8.8ab	10.4c	9.7bc	10.9c	13.5	12.7	0.002*
%PP	13.9ab	11.4a	12.5ab	12.4ab	15.4b	18.5	12.9	0.084
Absorción de H ₂ O (%)	125 b	131 b	135c	134 bc	117 a	128	105	0.002*

* Diferencias altamente significativas con probabilidad < 0.01

Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas de acuerdo a una prueba múltiple de rangos de Duncan (p=0.05)

Para el análisis estadístico de la pérdida de materia seca, pérdida de proteína y absorción de agua, solo se tomaron en consideración las dietas experimentales (dieta 1 a la 5).

En lo que respecta a las pérdidas por lixiviación, se obtuvieron diferencias significativas en lo que respecta a la materia seca (p=0.002) y no a la proteína (p=0.084). La pérdida de materia seca va aumentando conforme se reemplaza la HP por la HSA (de 8.1 a 10.9). La pérdida de proteína fue del orden de 13.9% en la dieta 1 con 0% de reemplazo y generalmente se incrementa al reemplazar la HP hasta un 15.4% en la dieta 5 (80% de reemplazo).

Con respecto al porcentaje de absorción de agua, las diferencias también fueron significativas (p=0.002) y el porcentaje fue aumentando conforme se reemplazaba la HP. Solo la dieta 5 (con 80% de reemplazo) muestra una reducida absorción de 116.7% diferenciándose del resto de las dietas.

El alimento comercial B presenta una composición proximal y pérdidas por lixiviación muy similares los alimentos experimentales, mientras el comercial A es mas bajo en proteína, y con menores pérdidas de materia seca y proteína en el agua. Ambos absorben menos agua que las dietas experimentales.

Tabla 3b.- Análisis proximal de los alimentos comerciales (% base húmeda), PMS, PP después de una hora de inmersión en agua marina, y absorción de agua

Alimento	6 Commercial A	7 Commercial B
Humedad	8.45	6.02
Proteína	31.1	36.63
Lípidos	8.46	10.14
Ceniza	10.09	10.64
Fibra	2	2.43
ELN	39.9	34.14
%PMS	4.29	12.60
%PP	9.35	13.01
%Absorción agua	80.41	93.81

Resultados del bioensayo de crecimiento

Los resultados del bioensayo de crecimiento a 14 y 28 días se presentan en las tablas 4 y 5. En contraste con los otros parámetros evaluados la sobrevivencia y la TCA (corregida y no corregida por lixiviación) obtenidas con todos los tratamientos, a los 14 y 28 días, no presentaron diferencias significativas. La sobrevivencia fue mayor o igual al 90% para todos los tratamientos y la TCA fue alrededor de 1.6, un valor habitual bajo condiciones experimentales.

A los 14 días el peso de los camarones que consumieron el alimento comercial B (dieta 7) fue significativamente ($P < 0.05$) menor al de los tratamientos experimentales 1, 3 y 4. Esta diferencia fue mas significativa ($p = 0.010$) a los 28 días con respecto a las 5 dietas experimentales, pero sin presentar diferencia significativa con el alimento comercial A (dieta 6). Adicionalmente solo el peso final de los camarones que consumieron la dieta 5 con 80% de reemplazo fue significativamente menor al obtenido con alimento control sin reemplazo.

De manera general, el consumo de alimento disminuyo paulatinamente con el incremento de inclusión de la HSA; sin embargo las diferencias solo fueron significativas ($p < 0.001$) a partir del alimento 4 con 65% de reemplazo. Por otra parte el consumo de los alimentos peletizados comerciales fue menor que el de los alimentos experimentales siendo solo significativamente menor el consumo del alimento comercial B (dieta 7).

Tabla 4.-Resultados del bioensayo de crecimiento

Tratamiento	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5	DIETA 6	DIETA 7	PROB.
Reemplazo	0%	35%	50%	65%	80%	Control 1	Control 2	ANOVA
Peso húmedo individual (g)								
Inicial	0.46± 0.09	0.45± 0.10	0.45± 0.10	0.46± 0.09	0.46± 0.09	0.45± 0.11	0.46± 0.09	P=0.281
14 días	1.18± 0.13 b	1.06± 0.02 ab	1.12± 0.08 b	1.13± 0.08 b	1.07± 0.03 ab	1.04 ±0.15 ab	0.95± 0.09 a	P=0.045
28 días	2.51± 0.42 d	2.23± 0.16 cd	2.34± 0.19 cd	2.21± 0.18 cd	2.11± 0.16 bc	1.83± 0.14 ab	1.73± 0.14 a	P=0.010*
Biomasa total (g)								
Inicial	4.58± 0.14	4.50± 0.16	4.49± 0.05	4.59± 0.15	4.61± 0.11	4.48± 0.03	4.65± 0.08	P=0.271
14 días	11.83± 1.25 c	10.94± 0.91 bc	11.20± 0.77 bc	10.98± 0.93 bc	10.41± 0.62 abc	9.92± 0.71 ab	9.28± 1.28 a	P=0.022*
28 días	24.43± 3.72 d	21.68± 0.60 cd	22.80± 2.47 cd	21.55± 1.94 cd	20.53± 1.75 bc	17.87± 2.21 ab	15.59± 1.29 a	P<0.001*
Consumo de alimento (g) corregido y no corregido por PMS								
14 días	1.15± 0.15 c	1.12± 0.11 c	1.12± 0.05 c	1.05± 0.06 bc	0.94± 0.07 ab	0.80± 0.06 a	0.83 ± 0.04 a	P=0.104
14 días corr.	1.06± 0.14 c	1.02± 0.10 c	1.01± 0.05 c	0.94± 0.05 bc	0.84± 0.06 ab	0.77± 0.06 a	0.73± 0.04 a	P<0.001*
28 días	3.67± 0.64 d	3.44 ± 0.21 cd	3.47± 0.29 cd	3.13± 0.21 bc	2.87± 0.17 b	2.36± 0.24 a	2.33± 0.23 a	P<0.001*
28 días corr.	3.38± 0.59 e	3.14± 0.19 de	3.11± 0.24 de	2.83± 0.19 cd	2.56± 0.15 bc	2.26± 0.24 ab	2.04± 0.20 a	P<0.001*
TCA corregida y no corregida por PMS								
14 días	1.61± 0.23	1.84± 0.16	1.69± 0.20	1.57± 0.10	1.55± 0.05	1.49± 0.10	1.76± 0.27	P=0.104
14 días corr.	1.48± 0.21	1.68± 0.15	1.52± 0.18	1.42± 0.09	1.38± 0.04	1.43± 0.09	1.54± 0.23	P=0.184
28 días	1.80± 0.17	1.94± 0.12	1.85± 0.19	1.79± 0.08	1.75± 0.10	1.71± 0.08	1.84± 0.14	P=0.323
28 días corr.	1.66± 0.16	1.77± 0.10	1.66± 0.17	1.62± 0.07	1.56± 0.10	1.64± 0.08	1.61± 0.12	P=0.405
Ganancia en peso (%)								
14 días	158.0± 24.9 c	134.6± 7.6 bc	149.6± 17.1 c	145.4± 14.6 bc	131.4± 9.1 bc	121.4± 15.0 ab	104.4± 21.7 a	P=0.003*
28 días	447.4± 83.1 d	394.8± 26.1 cd	420.4± 42.1 cd	381.7± 31.9 cd	356.8± 39.5 bc	307.6± 30.7 ab	273.1± 33.3 a	P<0.001*
Sobrevivencia(%)								
14 días	100± 0.0	100± 0.0	100± 0.0	97.5± 5.0	97.50± 5.0	100.00± 0.0	97.5± 5.0	P= 0.677

28 días	97.5± 5.0	97.5± 5.0	97.5± 5.0	97.5± 5.0	97.5± 5.0	97.5± 5.0	90± 0.0	P= 0.230
---------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	---------	----------

* Las diferencias son altamente significativas a una probabilidad < 0.01

Las letras en cada fila denotan diferencias significativas de acuerdo a la prueba múltiple de rangos de Duncan (p=0.05)

La ganancia en peso de los camarones a los 14 y 28 días fue significativamente diferente (p=0.003 y p<0.001 respectivamente) entre los tratamientos, presentando una buena correlación con el consumo. A partir la dieta 5 con 65% de reemplazo, el incremento en peso fue significativamente menor con respecto al control. En general los alimentos comerciales produjeron menor tasa de crecimiento que los alimentos experimentales, especialmente el alimento comercial B (dieta 7)

La biomasa total por acuario presento diferencias similares a las de los parámetros de peso final y tasa de crecimiento (p=0.002 y p<0.001 a 14 y 28 días respectivamente). La biomasa obtenida con los alimentos 0 a 65% de reemplazo (dietas 1 a 4) fue significativamente mayor a la obtenida con los alimentos comerciales 6 y 7, mientras que la biomasa de los camarones de la dieta con 80% de reemplazo (dieta 5) fue significativamente menor con respecto a la del alimento control sin reemplazo.

Como la sobrevivencia no fue afectada por ninguno de los tratamientos evaluados, se puede considerar que las diferencias encontradas en incremento en peso y en biomasa están directamente relacionadas al consumo de alimento. Una menor atractabilidad, palatabilidad o una mayor dureza de los pellets comerciales A y B podría explicar este resultado.

Las mejores tasas de eficiencia proteica (PER) (p=0.003) y de utilización proteica neta (NPU) (p=0.006), se obtuvieron con el alimento comercial A (dieta 6) seguido por los alimentos experimentales sin reemplazo o con reemplazo al 80%. Los valores de los tratamientos con reemplazos intermedios fueron menores y similares a los obtenidos con el alimento comercial B.

Tabla 5.- Tasa de eficiencia proteica (PER) y utilización proteica neta (NPU) de los camarones con las diferentes dietas

Dieta	1	2	3	4	5	6	7	Prob.
reemplazo	0%	35%	50%	65%	80%	comercial A	comercial B	ANOVA
PER	1.62±0.17 a	1.51±0.09 a	1.58±0.16 a	1.60±0.07 a	1.65±0.11 a	1.88±0.08 b	1.49±0.11 a	0.003*
PERcorr	1.88±0.20 abc	1.71±0.10 a	1.80±0.18 ab	1.83±0.08 ab	1.95±0.12 bc	2.08±0.09 c	1.71±0.13 a	0.010*
NPU	0.28±0.03 a	0.26±0.01 a	0.28±0.03 a	0.28±0.01 a	0.29±0.02 a	0.32±0.01 b	0.26±0.03 a	0.006*
NPUcorr	0.33±0.03 abc	0.30±0.01 a	0.31±0.03 ab	0.32±0.01 abc	0.34±0.02 bc	0.35±0.01 c	0.30±0.03 a	0.018

* Las diferencias son altamente significativas a una probabilidad <0.01

Las letras en cada fila denotan diferencias significativas de acuerdo a la prueba múltiple de rangos de Duncan (p=0.05)

Resultados de digestibilidad

Digestibilidad de las dietas

Los resultados de digestibilidad aparente de proteína (DAPD), material seca (DAMSD) y energía (DAED) en las dietas, así como la corrección de los coeficientes de digestibilidad proteica (DAPDlixcorr.) y de materia seca (DAMSDlixcorr.) por la pérdida de nutrientes en agua, se presentan en la tabla 6.

Los valores de digestibilidad para todas las dietas fueron mayores a 80%, pero en todos los casos se presentaron diferencias significativas.

La digestibilidad de la proteína mostró diferencias que estuvieron al límite de significancia (p= 0.06). La dieta 3 con 50% reemplazo (DAPD 86.9%) obtuvo un valor más bajo que la dieta 4 con 65% reemplazo (DAPD 90.5%) pero no fue diferente a ninguna de las otras dietas. La DAMSD mostró diferencias a un nivel muy significativo (p= 0.009), la dieta 3 obtuvo el valor más bajo de 83% mientras que la dieta 4 desplegó el valor más alto con 87.8%, pero no se observaron diferencias en ninguna de las otras dietas.

Una tendencia similar se observó para la digestibilidad de la energía (p = 0.001); las dietas 2 (88.4%) y 3 (87.9%) presentaron valores significativamente más bajos que las dietas 1 (90.45%), 4 (90.48%) y 5 (90.52%).

Tabla 6.- Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína, material seca y energía en las dietas y correcciones por las pérdidas debido a la lixiviación antes de la ingestión (media de 4 valores replicados \pm desviación estándar)

Dieta	1	2	3	4	5	ANOVA
reemplazo	0%	35%	50%	65%	80%	
DAPD	88.9 \pm 2.0 ab	89.2 \pm 0.8ab	86.9 \pm 0.6a	90.5 \pm 0.7 b	89.3 \pm 2.6ab	0.06
DAMSD	85.5 \pm 2.6b	85.3 \pm 1.1ab	83.0 \pm 0.7a	87.8 \pm 1.1b	86.7 \pm 1.6b	0.009*
DAED	90.5 \pm 1.0 b	88.4 \pm .9 a	88.0 \pm 1.4a	90.5 \pm 0.6 b	90.5 \pm 0.9 b	0.001*
DAPD	87.1 \pm 2.3ab	87.8 \pm 0.9ab	85.0 \pm 0.7a	89.1 \pm 0.8b	87.4 \pm 3.1ab	0.077
lixcorr.						
DAMSD	84.3 \pm 2.9b	83.9 \pm 1.2b	81.0 \pm 0.8a	86.5 \pm 1.2b	85.0 \pm 1.8b	0.008*
lixcorr.						

* Las diferencias son altamente significativas a una probabilidad <0.01

Las letras en cada fila denotan diferencias significativas de acuerdo a la prueba múltiple de rangos de Duncan ($p=0.05$)

Es posible que la interacción de las 2 diferentes harinas al nivel de 50% de substitución, de algún modo cause la caída observada en la digestibilidad, como se puede ver para la digestibilidad aparente de la proteína, digestibilidad aparente de la materia seca y digestibilidad aparente de la energía de las dietas; lo cual se debe probablemente a los efectos asociativos que presentan estos dos ingredientes con el resto de la dieta es decir que al estar presentes ambos a un en las mismas proporciones, hacen que el resto de los ingredientes se digieran en una menor proporción provocando que la digestibilidad global de la dieta se vea disminuida (Brown *et al.* 1989; Lee y Lawrence, 1997).

Cuando se corrigió por lixiviación, las diferencias se mantuvieron virtualmente iguales con una $p=0.08$ para $DAPD_{lixcorr}$ y $p=0.008$ para $DAMSD_{lixcorr}$ ya que las tasas de lixiviación fueron muy similares para todas las dietas. Los valores corregidos por lixiviación, fueron ligeramente mas bajos que los valores no corregidos, porque los nutrientes perdidos en el agua ya no fueron considerados como ingeridos y digeridos por el camarón.

La digestibilidad de las dietas de referencia se muestra en la tabla 6b.

Tabla 6b.- Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína y materia seca de las dietas y ajustes por las pérdidas debido a la lixiviación antes de la ingestión. (Media de 4 valores replicados \pm desviación estándar)

	Dieta Ref 1 (HP)	Dieta Ref 2 (HSA)
DAPD	90.5 \pm 0.4	87.3 \pm 2.4
DAMSD	88.2 \pm 0.8	84.7 \pm 4.7
DAED	90.1 \pm 1.3	87.7 \pm 3.8
DAPD lixcorr	88.5 \pm 0.5	85.4 \pm 2.8
DAMSD lixcorr	86.4 \pm 1.0	82.4 \pm 5.4

La dieta de referencia #2 (para determinar la digestibilidad de la HSA-GM) muestra valores mas bajos que la dieta de referencia #1 (para determinar la digestibilidad de la harina de pescado) en todas las variables, lo cual fue inesperado, y parece ser debido a la presencia de 11% de harina de pescado en la formula de la dieta Ref 2, ya que es la principal diferencia entre las dos dietas, excepto alguna variación no controlada en el proceso de esta dieta.

Digestibilidad de los ingredientes

Los resultados de digestibilidad de proteína, materia seca y energía de los ingredientes (harina de pescado y avícola) así como el ajuste de estos coeficientes por la lixiviación de materia seca y proteína en agua, se presentan en la tabla 7.

Tabla 7.- Digestibilidad aparente de proteína, materia seca y energía de los ingredientes obtenidos por la determinación estándar y corregida por las pérdidas debido a la lixiviación antes de la ingestión. (Media de 4 valores replicados \pm desviación estándar)

	Harinas de pescado	HSA-GM	ANOVA
DAPI	87.9 \pm 2.7	90.4 \pm 4.4	0.373
DAMSI	81.4 \pm 6.7 a	90.8 \pm 5.1 b	0.068
DAEI	83.3 \pm 2.4 a	97.6 \pm 3.1 b	<0.001*
DAPI lixcorr	94.5 \pm 3.3	96.5 \pm 5.4	0.563
DAMSI lixcorr	81.4 \pm 6.7 a	90.2 \pm 5.5 b	0.088

* Las diferencias son altamente significativas a una probabilidad <0.01

Las letras en cada fila denotan diferencias significativas de acuerdo a la prueba múltiple de rangos de Duncan (p=0.05)

En lo que se refiere a la digestibilidad de la proteína tanto sin corregir como corregida por la lixiviación en agua, las diferencias entre los dos ingredientes no fueron significativas. La harina de pescado presento un valor de 87.9% \pm 2.7 y la avícola de 90.4% \pm 4.4 sin corregir. Los valores corregidos fueron más altos: 94.5% \pm 3.3 para la harina de pescado y 96.5% \pm 5.4 para la avícola,

lo que sugiere que la proteína digestible es mas soluble en los otros ingredientes de la dieta que en las harinas de pescado y avícola (un mayor valor de digestibilidad proteica en el ingrediente es determinado por una mayor diferencia en la proteína digerible entre la dieta prueba y la dieta de referencia).

Por otro lado en lo que respecta a la digestibilidad de la materia seca tanto sin corregir como corregida, las diferencias fueron significativas solo a un nivel de 10% ($p=0.07$ y $p=0.08$ respectivamente) siendo mayor en ambos casos la digestibilidad de la HSA-GM. Los valores sin corregir fueron 81.4% para la harina de pescado y 90.8% para la HSA-GM, y corregidos 81.4% para la harina de pescado y 90.2% para la HSA-GM. La diferencia a favor de la HSA-GM puede ser explicada en parte por su bajo contenido de ceniza (la ceniza es poco digerible), pero también en parte porque la dieta de referencia 2 presento coeficientes de digestibilidad inferiores a los de la dieta de referencia 1. El bajo valor de digestibilidad de la dieta de referencia 2 de hecho parece congruente con la presencia de la mezcla de harinas de pescado, cuyo valor de digestibilidad de materia seca es relativamente bajo.

Por otro lado la digestibilidad de energía si presento una diferencia altamente significativa entre las dos harinas ($p<0.001$) siendo la HSA-GM la que se digirió mas con un valor de 97.6% en comparación con la harina de pescado que presento un valor de 83.3%.

El contenido de lípidos de la HSA-GM fue alto y esta harina es rica en colesterol y fosfolípidos. Como el colesterol y los fosfolípidos son altamente digestibles, esto puede explicar parcialmente la mayor digestibilidad de la energía en la HSA.

Curiosamente, los altos valores de digestibilidad de material seca y energía en la harina avícola no provocaron un aumento substancial de digestibilidad con el reemplazo de las harinas de pescado con la avícola (tabla 6). Eso esta en contradicción con la diferencia de digestibilidad a favor de la harina avícola, y refuerza la hipótesis de algún artefacto en el proceso de la dieta de referencia 2 que haya disminuido su digestibilidad.

Discusión y conclusión

Bajo las condiciones del presente estudio, la HSA puede reemplazar sin ningún efecto negativo hasta el 50% de la mezcla de harinas de pescado en un alimento con 35% de proteína, reduciendo el contenido de harina de pescado de un 39 a un 19.5 %. Esto coincide con los resultados obtenidos por Davis y Arnold (2000) quienes demuestran la factibilidad de reemplazar harina de menhaden hasta en un 80% en alimentos con 32% de proteína y 30% de menhaden, con un producto coextruido a base de subproductos avícolas con soya y huevo (53.1% proteína cruda), sin obtener ningún efecto aparente en sobrevivencia o crecimiento del camarón. Así mismo concuerda con los resultados obtenidos por Samocha *et al.* (2004), quienes llegan a reemplazar el 100% de harina de menhaden con el mismo producto en tanques exteriores con producción primaria. Otro producto a base de subproductos avícolas secados por flash-dry, evaluados por Davis y Arnold (2000) con un contenido de proteína de 72%, también permitió reemplazar el 80% de la proteína de menhaden en alimentos con 32% de proteína, mejorando en este caso significativamente el incremento en peso y la eficiencia alimenticia, y esto, reduciendo el contenido de harina de pescado en sus alimentos prácticos de 30 a 6% (peso seco). A diferencia de estudios anteriores, en este trabajo se determinó la digestibilidad de HSA y de la mezcla de HP substituida, así como la digestibilidad de los alimentos evaluados, y se comprobó que las HSA presenta una DAP igual a la de la mezcla de HP, y valores de DAMS y DAE ligeramente mejores a las de la mezcla de HP.

El reemplazo de 35, 50, 65 y 80% de la HP con HAS no afectó significativamente la digestibilidad proteica de los alimentos experimentales. La digestibilidad de materia seca y energía de los alimentos con 65 y 80% de reemplazo tampoco se modificaron significativamente, pero en la dieta con 50% de reemplazo ambos parámetros curiosamente disminuyeron al igual que disminuyó el PER y el NPU

La respuesta favorable de los camarones a la HSA usada en el presente estudio se debe probablemente a la alta calidad de las materias primas y a la tecnología de procesamiento usada, con beneficios en términos de perfil de nutrientes y digestibilidad, así como a la ausencia de problemas de palatabilidad. Davis y Arnold (2000) y Samocha *et al.* (2004) también encontraron

Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., Guajardo-Barbosa, C. y Scholz, U. 2004. Uso de Harina de Subproductos Avícolas en Alimentos para *L. vannamei*. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora,

que *L. vannamei* no presento problemas de palatabilidad cuando los productos avícolas fueron usados para reemplazar la harina de menhaden.

En el presente estudio, el reemplazo de 50% de HP por la HAS no solo no afecto adversamente el consumo, el peso final, el crecimiento, la digestibilidad de los alimentos sino que genero una serie de ventajas. Estas ventajas incluyen una reducción en el contenido de ceniza de los alimentos, no requerir la adición de aditivos atractantes o nutricionales como amino ácidos, proveer colesterol y fosfolípidos, que son nutrientes necesarios y caros, y finalmente tener un costo menor que el de harina de pescado. Este beneficio en el costo puede ser variable dependiendo del costo local de los ingredientes y del nivel de harina de pescado usado en la formula de base. En este caso el reemplazo del 50% de las HP represento aproximadamente un ahorro de 27 dólares por tonelada de alimento, lo cual es interesante considerando la necesidad global de reducir los costos de producción.

Finalmente es interesante remarcar que los alimentos experimentales con todos los niveles de reemplazo de HP usados dieron resultados iguales o mejores que los 2 alimentos comerciales evaluados con 31 y 35% de proteína, lo que demuestra que con diferentes niveles de proteína se pueden obtener los mismos resultados, dependiendo de la calidad de ingredientes usados en la formula..

References

- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A.L. 1999. Nutrición de los camarones peneidos para la industria de los alimentos comerciales. In: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D. y Mendoza-Alfaro R. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola I - Memorias del Primer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Monterrey, N.L., 22-24 February, 1993, 2ª re-impresión 1999. ISBN 968-7808-60-8, 43-79.
- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis. 12th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Ellian Horritz Ed., Washington, D.C. 684 pp.
- A.O.C.S.(1989). Official Method. Ja 4-46. Sampling and analysing lecithins.
- Brown P., Robinson, E., Clark, A. and Lawrence, A.L. 1989. Apparent Digestible Energy Coefficients and Associative Effects in Practical Diets For Rid Swamp Crayfish. Journal of The World Aquaculture Society Vol.20 (3):122 – 126.
- Cho, C.Y. and Slinger, S. 1979. Apparent Digestibility Measurement in Feedstuffs for Rainbow Trout. Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Vol. II. P:239-247.
- Corchaine, A.J., W. H. Miller and D.B. Stein JR. (1959) Clin. Chem. 5, 609.
- 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.
- Lee, P. and Lawrence, A.L. 1997. Digestibility. Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture. Volume 6 World Aquaculture society. Pp194-259
- Maynard, L.A., Loosli J.K., Hintz, H.F., Warner, R.G. 1981. Nutrición animal. Cuarta edición. McGraw Hill, U.S.A. 640 pp.
- Nieto López, M.G., Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. 1997. Implementación de un método para la determinación de óxido de cromo y proteína de micromuestras de alimento y heces de camarón. In: Proceedings of an International Conference: VI Reunion de Nutrición Animal, 22-24 Oct. 1997, Marín, NL., México. Universidad Autónoma de Nuevo León/Facultad de Agronomía, Monterrey, México, pp. 211-214.
- Parr. 1992. Operating instruction manual No. 280 MM, of 1425 semi micro calorimeter pump.
- Samocha, T.M., Davis, D.A., Saoud, I.P., DeBault K. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 231, 197–203
- Smith, D.M. 2000. Personal communication. CSIRO Marine Research, Queensland, Australia.
- Tecator, 1983. Fat extraction on feeds with the Soxtec System HT- The influence of sample preparation and extraction media. Application note AN 67/83 (1983.06.13). Soxtec System HT Manual Tecator., AB Sweden.
- Tecator, 1987. Determination of Kjeldahl Nitrogen Content with Kjelttec System 1026. Application note AN 86/87 (1987.02.18). Kjelttec 1026 Manual, Tecator AB, Sweden.