

Predicción de la Digestibilidad de Proteína en el Camarón y Uso de Ingredientes Proteicos de Segunda Generación en Alimentos para Acuicultura.

Fernando Luis García-Carreño

CIBNOR. PO Box 128, La Paz, BCS, México 23000. +fax (112) 54710. e-mail <fgarcia@cibnor.mx>

El conocimiento de la alimentación de organismos acuáticos es necesario para una acuicultura rentable. Una alimentación eficiente depende del conocimiento de cómo los organismos utilizan los diversos componentes de la dieta. En acuicultura, han sido realizados experimentos de alimentación para medir el valor nutritivo de las dietas suministradas en función del crecimiento. Sin embargo, estos métodos son costosos, consumen tiempo, y los resultados pueden ser afectados por factores ambientales (Lan y Pan 1993). El alimento es el costo variable más importante en el cultivo de camarón, representando hasta el 60% de los costos totales (Akiyama et al. 1992). Ya que la proteína es el ingrediente más costoso en la dieta del camarón (Akiyama et al. 1992) y la calidad de ésta resulta crítica para la respuesta de crecimiento (Sudaryno et al. 1995). Actualmente la investigación en el área de alimentos para acuicultura se está enfocando en diversas fuentes más económicas de proteína. Idealmente, estas deberían de encontrarse fácilmente en el mercado, a bajo costo, tener alta calidad nutritiva (Sudaryno et al. 1995), y que no presenten factores antinutricionales tales como: inhibidores de enzimas digestivas, lectinas, fenoles, etc.

Los métodos clásicos para la determinación de la cantidad y calidad de proteína incluyen el análisis Kjeldahl y determinación de la composición de aminoácidos. Estos métodos involucran reacciones más severas que aquellas que ocurren durante la digestión natural, y liberan nutrientes que serían inaccesibles para el animal (Anderson et al. 1993). Se ha dado una considerable atención hacia la búsqueda de un método rápido y confiable para evaluar la digestibilidad de la proteína y a las propiedades de las enzimas asociadas al tracto digestivo que determinan la capacidad del organismo bajo estudio para hidrolizar la proteína (Pederson y Eggum 1983). Son necesarios métodos *in vitro* para evaluar la digestibilidad de la proteína debido a que son más rápidos y menos costosos que los métodos *in vivo*, ya que utilizando solo una pequeña cantidad de materia prima es posible realizar una evaluación más detallada del porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados en la proteína del alimento (Grabner 1985). Existe una alta correlación entre métodos *in vitro* e *in vivo*, únicamente cuando las proteínas son comparadas según su origen; animal o vegetal. En muestras que contienen ambos tipos de proteína, las evaluaciones enzimáticas *in vitro* proporcionan una estimación de la digestibilidad de la proteína (Pederson y Eggum 1983).

García, C. F. L. 2000. Predicción de la digestibilidad de proteína en el camarón y uso de ingredientes proteicos de segunda generación en alimentos para acuicultura. pp 440-451 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

El uso del método de pH-stat para evaluar la digestibilidad de proteína, monitoreando el grado de hidrólisis ofrece algunas ventajas: 1) mantiene el pH constante durante el proceso de la digestión sin necesidad de usar amortiguadores fisiológicos y, 2) el valor de la hidrólisis de la proteína puede estimarse rápidamente mediante el monitoreo automático de la curva de titulación generada (Pederson y Eggum 1983). Recientemente, Dimes y Haard (1994), desarrollaron un método *in vitro* usando extractos enzimáticos de ciegos pilóricos de salmónidos para evaluar la digestibilidad de la proteína mediante ensayos de pH-stat. Ellos concluyeron que el método de pH-stat fue el más preciso para evaluar la digestibilidad de fuentes alternas de proteína para alimentos destinados a salmónidos. Lan y Pan (1993), determinaron digestibilidad *in vitro* de ingredientes proteicos para *Penaeus monodon* usando un extracto enzimático de hepatopáncreas del camarón. Sin embargo, debido a que los resultados no fueron confrontados con datos de digestibilidad *in vivo* el método no fue validado.

El método de pH-stat determina el grado de hidrólisis de proteína (GH) usando las propias enzimas digestivas del animal en estudio. El objetivo del presente estudio fue evaluar la digestibilidad de la proteína por el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, mediante ensayos *in vitro* con el método de pH-stat, utilizando una preparación enzimática de hepatopáncreas del camarón. Los resultados del ensayo *in vitro* son comparados con los valores de digestibilidad aparente *in vivo* usando análisis estadístico.

El conocimiento de la digestibilidad de proteína es importante en la formulación de dietas, porque los animales deben consumir proteína dietaria para abastecerse de aminoácidos. El uso de la proteína es afectado por la naturaleza de la fuente proteica, su nivel de consumo y la capacidad de un organismo para usar otros componentes de la dieta. La calidad de la proteína es afectada por la frescura de la materia prima, la cantidad de lípidos, el proceso de secado y si la fuente de proteína proviene de pescado entero o de desperdicios de la pesca (Anderson et al. 1993).

Los métodos para evaluar factores antinutricionales en ingredientes y alimentos, tales como inhibidores de proteinasas, incluyen ensayos *in vivo* e *in vitro*. Ya han sido descritas varias técnicas de laboratorio. Un ensayo de electroforesis es útil para detectar inhibidores de proteasas del sistema digestivo (García-Carreño *et al.* 1993) y ha sido aplicado para varias especies en cultivo, incluyendo peces y camarones. El ensayo llamado S-SDS-PAGE es capaz de detectar inhibidores de proteinasa en mezclas complejas tales como extractos de semillas o alimentos microencapsulados. Un ensayo combinado que incluye S-SDS-PAGE y el grado de hidrólisis por pH-stat puede detectar inhibidores de proteinasas y una reducción de la actividad inhibitoria aplicando un tratamiento térmico a los ingredientes que contienen los inhibidores (García-Carreño et al. 1997).

La proteína es el ingrediente más importantes en la formulación de dietas destinadas a alimentar organismos en cultivo bajo la premisa de que estas dietas deben ser altamente nutricias y económicamente rentable. Económicamente rentables, ya que cerca del 60% del costo total de la producción del alimento se destina a ingredientes proteicos de fuente animal y vegetal. El aspecto nutricional es de suma importancia porque los aminoácidos que aportan la fuente proteica de la dieta van a ser utilizados por el organismo para formar tejido; "crecimiento" y esto, en acuicultura es lo más importante. Actualmente, para cubrir los

requerimientos de aminoácidos para cada organismo en particular, la dieta se formula con un exceso de proteína. Tanto la proteína no consumida y la no digerida se acumulan en el medio, aumentando el contenido de nitrógeno del agua en los estanques de cultivo, afectando negativamente el rendimiento de los organismos cultivados. El conocimiento de la digestibilidad de proteína por organismos cultivados rendirá beneficios económicos y ecológicos.

Comúnmente, las fuentes de proteína animal para camarón y peces provienen de harinas de pescado. Las harinas de pescado se fabrican usando los desperdicios de la industrialización de pesquerías o con especies de pescado sin valor comercial. Estas fuentes de proteína naturalmente tienen un buen balance de aminoácidos esenciales y micronutrientes. Sin embargo, comúnmente la materia prima es tratada de manera inadecuada, ocasionando pérdida de sus propiedades nutricias y funcionales. La pesquería destinada a la producción de harina comúnmente es transportada a la fábrica sin tomar precauciones para evitar daños a la materia prima. Las plantas productoras de harina de pescado carecen de métodos de control de calidad para evaluar la frescura de la materia prima, tales como: la medida del índice K, aminas biogénicas y rancidez. La harina de pescado comúnmente se elabora abusando de la temperatura, principalmente durante el proceso de secado. El abuso de temperatura durante el manejo de la materia prima y producto genera una serie de reacciones químicas que reducen la digestibilidad de la proteína y la biodisponibilidad de los aminoácidos. Las proteínas de los alimentos son altamente reactivas y durante el procesado pueden sufrir algunos cambios (Papadopoulos 1989), principalmente reacciones entre carbohidratos reductores y proteínas, y reacciones proteína-proteína. Cuando se abusa de la temperatura durante el proceso de secado, los carbohidratos y lípidos reaccionan con el grupo α -amino de la lisina y el grupo reactivo carbonyl de los azúcares reductores o con los productos de la oxidación de los lípidos. En tecnología de alimentos, la reacción entre las proteínas y sustancias reductoras se llama: reacción de Maillard o reacción no-enzimática de obscurecimiento.

Las reacciones proteína-proteína ocurren en ausencia de sustancias reductoras a altas temperaturas. El calor ocasiona la formación de nuevos enlaces entrecruzados dentro de las moléculas de proteína. Hay muchas reacciones posibles entre diferentes cadenas de aminoácidos. Las más comunes son: la formación de enlaces isopeptídicos entre el grupo α -amino de la lisina y el grupo carboxyl libre del ácido aspártico o los grupos amida de la asparagina o de la arginina y la formación de nuevos aminoácidos por la biodegradación de aminoácidos, tales como la lisinoalanina, lanthionina, y ornithioalanina. Además de las reacciones químicas que alteran la composición de aminoácidos en una proteína, el calor excesivo conduce a la destrucción de estos por descomposición o racemización. La racemización ocasiona que los L-aminoácidos en la proteína cambien a D-aminoácidos. Aminoácidos L- y D- no se pueden diferenciar por métodos químicos o análisis de HPLC, sin embargo D-aminoácidos no pueden ser incorporados en la síntesis de proteína por ningún organismo conocido. El abuso de calor puede ocasionar pérdida de hasta el 50% de la biodisponibilidad de aminoácidos en el ingrediente proteico del alimento.

Los fabricantes de harina de pescado secan el producto por una técnica llamada "quemado" usando en la mayoría de los casos fuego directo. Sin embargo, los fabricantes no tienen control de calidad para evaluar las repercusiones por abuso de calor. Las partículas oscuras que con frecuencia se ven en las harinas de pescado son cenizas generadas durante el

secado. La producción de harina de pescado es de cierta manera una tragedia ecológica. Quemar una fuente rica en proteína es un atentado del hombre hacia los recursos naturales.

Las técnicas aplicadas a la producción de ingredientes proteicos son diversas, las harinas de pescado, concentrados, aislados y ensilados son algunos ejemplos de productos de estas tecnologías. La mayoría de ellos presentan desventajas tecnológicas. La harina de pescado ya ha sido discutida. En la producción de concentrados de proteína se usan solventes orgánicos para eliminar los lípidos, esta técnica disminuye las propiedades funcionales de las proteínas; baja solubilidad en agua que evita la incorporación apropiada de la proteína al alimento y por consecuencia baja digestibilidad. Los aislados son proteínas de pescado y crustáceos solubles en agua; éstas son principalmente proteínas miosaroplásmicas, dejando las proteínas miofibrilares insolubles sin recuperar. Ensilados (en silos); es un proceso de conservación de las proteínas en donde se usan microorganismos anaeróbicos ácido lácticos, ácidos orgánicos o inorgánicos. Esta técnica lleva tiempo (semanas o meses), trabajo y almacenaje intensivo.

Los tecnólogos de alimentos han trabajado sobre el desarrollo de técnicas apropiadas que conserven la riqueza nutritiva natural de los productos de las pesquerías. Los grupos en Chile y Kodiak, Alaska están produciendo las harinas de pescado llamadas calidad "premium" (Romero et al. 1994), basándose en secado no destructivo (Babbitt et al. 1994). Sin embargo, se han generado tecnologías en alimentos que deberían ser consideradas para incluirlas en la formulación de alimentos para acuicultura. Con el desarrollo de la biotecnología, se han generado nuevos métodos para el procesado de alimentos. Ha surgido un método amigable para la recuperación de proteína soluble e insoluble de los productos de la pesquería llamado hidrolizado de proteína. Los hidrolizados de proteína son productos proteicos obtenidos por hidrólisis controlada de la proteína por medio de proteinasas exógenas. La hidrólisis controlada genera polipéptidos que son separados fácilmente de otros materiales del tejido tales como: lípidos, escamas, huesos y tejido conjuntivo. Posteriormente los péptidos son recuperados por medios físicos como centrifugación o filtración. El concepto de grado de hidrólisis, desarrollado por el Dr. Jens Adler-Nissen de Industrias Novo, Dinamarca (1986) generó el conocimiento teórico para la producción en el laboratorio y la industria de hidrolizados de proteína con las propiedades funcionales deseadas.

Los hidrolizados de proteína ya están actualmente en el mercado. Las materias primas son diversas; el pescado blanco, desperdicios de la pesca, desechos de la industria de alimentos, krill, etc. Los hidrolizados de proteína son los ingredientes proteicos de segunda generación para dietas destinadas a acuicultura. Algunos ensayos han demostrado las ventajas de sustituir harinas de pescado por hidrolizados de proteína. Anggawati et al. (1990), reemplazaron 3, 5, y 8% de harina de pescado por hidrolizado de proteína en el alimento para camarón *Penaeus monodon*, encontrando que presentaron un peso final de 3.9-4.4 g, un crecimiento específico (SRG) de 2.5-2.6, una sobrevivencia mayor a 75%, y un factor de conversión (FCR) de 2.9-3.0. En comparación, el camarón alimentado con una dieta que no contenía hidrolizados de proteína presentaron un peso final de 3.0 g, SRG de 1.9%, sobrevivencia de más de 75%, y FCR de 4.3. No hubo diferencias importantes entre las dietas que incluyeron hidrolizados de proteína.

Recientemente, varias compañías se han involucrado en la producción de hidrolizados de proteína. La empresa Specialty Marine Products, West Vancouver, Canadá, está produciendo diferentes variedades de productos del krill: liofilizado, secado por aspersion (spray dried) y en

forma líquida. Según el fabricante, el hidrolizado de proteína liofilizado mantiene las enzimas digestivas del krill activas. Este producto podría ser de beneficio para los acuicultores porque el alimento complementado con enzimas digestivas aumenta el crecimiento final del camarón durante algunas etapas del cultivo. Natural Biopolymer Inc., situada en Washington esta produciendo hidrolizados de pescado blanco. Esta información muestra esos hidrolizados de proteína que están ya en el mercado y disponible para ensayos. Como se esperaba, después de los resultados desde Anggawati et al. (1990), el uso de los ingredientes de proteína producidos bajo procesos suaves que permiten la conservación del valor nutritivo de los productos de mar rendirán beneficios para los acuicultores. Es de esperar que al usar mejores ingredientes proteicos que los generalmente aceptados como "requerimientos mínimos" de proteína pueden ser reducidos mejorando la digestibilidad y asimilación.

Nuestro grupo en CIBNOR está realizando ensayos utilizando dietas basadas en ingredientes proteicos de segunda generación de pescado, krill, calamar y algunos que contienen enzimas digestivas. El trabajo del grupo de investigación está basado en la idea de que algunas tecnologías de alimentos ayudarán a los acuicultores a hacer de la acuicultura una actividad de beneficio sustentable.

En la figura 1 se observa la digestibilidad de proteína de diferente origen cuando fue digerida por enzimas digestivas de camarón usando el método de pH-stat. La digestibilidad es expresada en grado de hidrólisis (%). Se muestra que proteína obtenida de diferentes materias primas y secadas por técnicas abusivas o amigables influye en la digestibilidad de la proteína. La harina de pescado producida con pescado entero, manteniendo estricto control de la materia prima y procesado (KRI) es la que presentó mejor digestibilidad, La harina de pescado producida con desechos del enlatado de atún, en condiciones de abuso a la materia prima y durante el procesado fue la que mostró peor digestibilidad (Tuna waste). La harina de langostilla, un ingrediente actualmente en desarrollo, mostró pobre digestibilidad. La harina de soya mostró digestibilidad intermedia. La figura 2 muestra la correlación entre la digestibilidad de proteína evaluada por la técnica de digestibilidad aparente *in vivo* y la evaluada usando la técnica de pH-stat con enzimas de camarón. La correlación ideal se contrasta con la obtenida usando la técnica de pH-stat con enzimas comerciales (FES) y la de pH-stat con enzimas de camarón (SHE). Dada la correlación se valida la técnica para predecir la digestibilidad de ingredientes proteicos y de alimentos formulados. La figura 3 muestra el efecto de inhibidores de semillas de leguminosas en la actividad enzimática de proteinasas de camarón. Se compara el efecto de inhibidores de diferentes leguminosas sobre dos especies de camarón. En ambos camarones, la actividad enzimática se ve reducida en más del 40% de la actividad control sin inhibidores sobre un sustrato proteico. Las enzimas de *Litopenaeus vannamei* fueron más severamente afectadas por los inhibidores que las enzimas de *Farfantepenaeus californiensis*. La leguminosa con mayor capacidad de inhibición es Olneya tesota. La figura 4 muestra el efecto del tratamiento térmico de inhibidores de dos leguminosas sobre el grado de hidrólisis con un sustrato proteico sobre enzimas de camarón y comerciales. Se observa que la capacidad de reducción de la actividad enzimática de inhibidores de leguminosas es disminuida por el tratamiento térmico, incrementándose significativamente el grado de hidrólisis de enzimas de camarón y comerciales. Los inhibidores de gandul (pigeon pea) son más sensibles al tratamiento térmico.

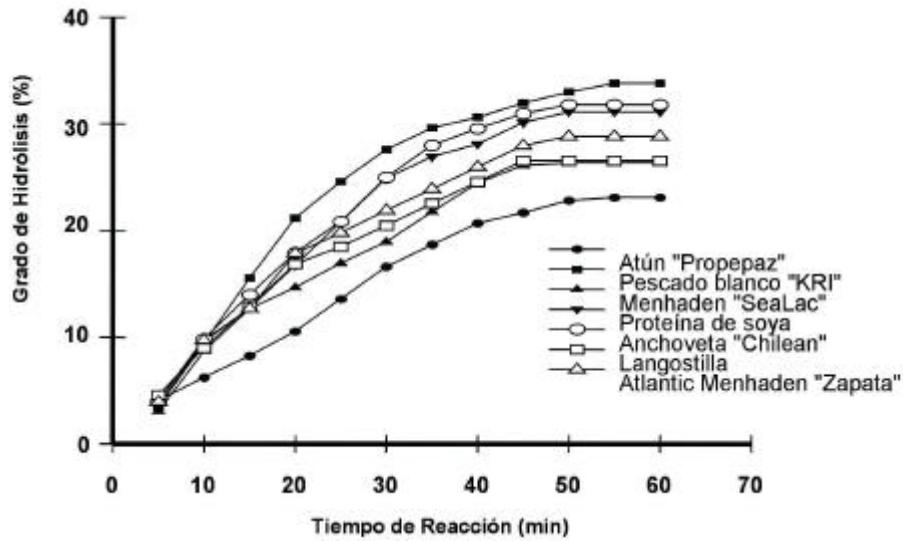


Figura 1. Digestibilidad de proteína de diferente origen cuando fue digerida por enzimas digestivas de camarón usando el método de pH-stat.

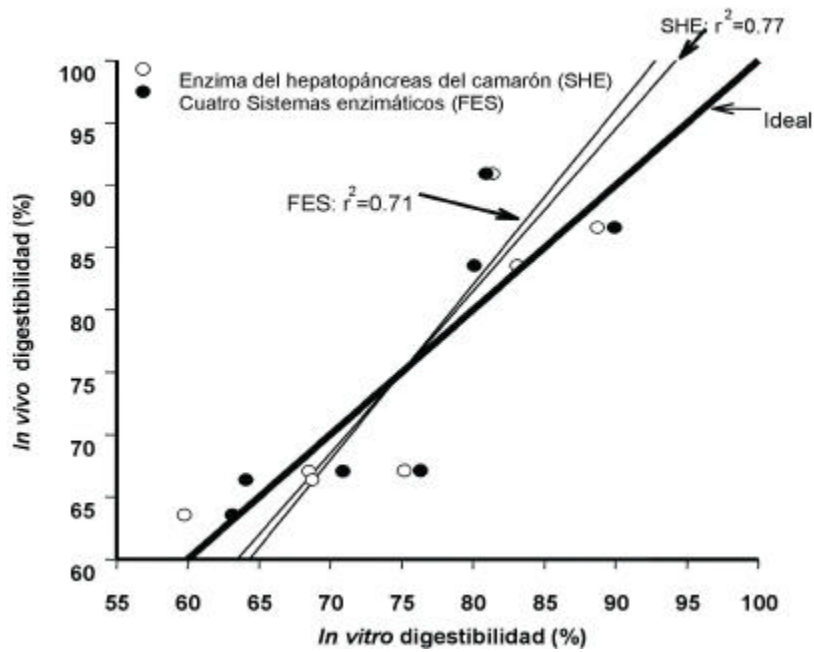


Figura 2. Correlación entre la digestibilidad de proteína evaluada por la técnica de digestibilidad aparente in vivo y la evaluada usando la técnica de pH-stat con enzimas de camarón

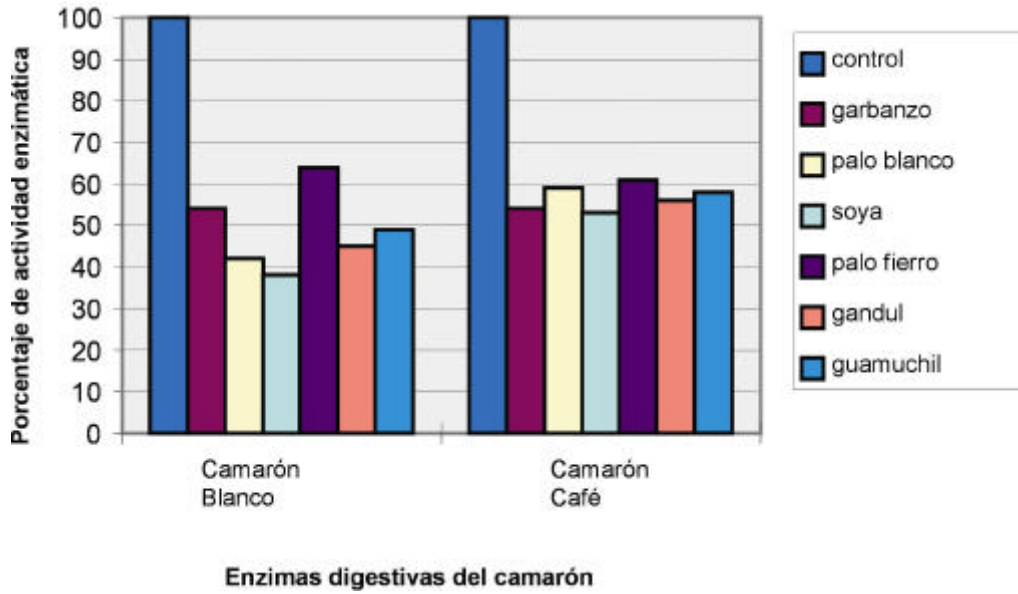


Figura 3. Efecto de inhibidores de semillas de leguminosas en la actividad enzimática de proteinasas de camarón

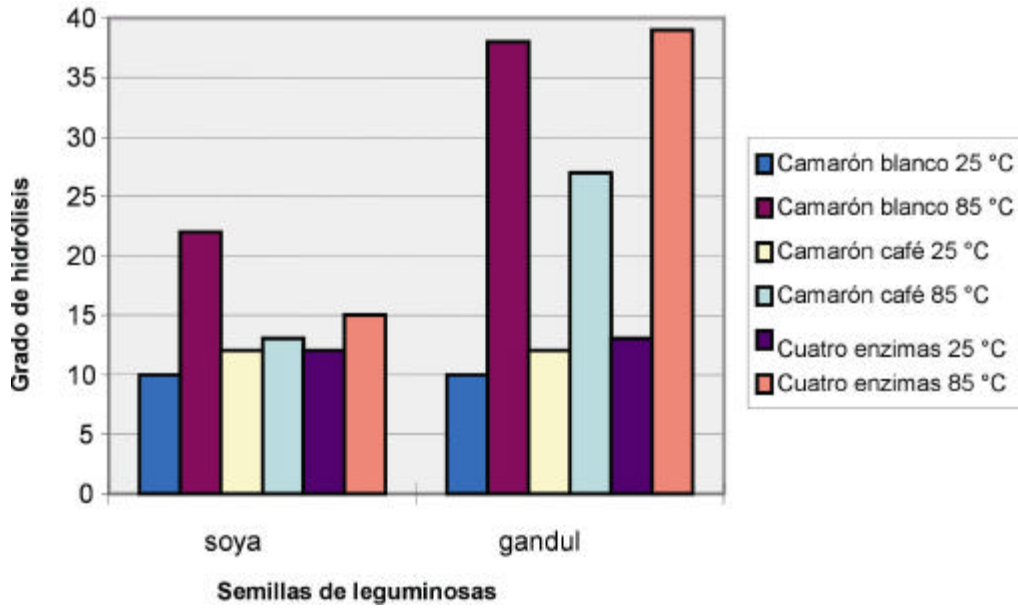


Figura 4. Efecto del tratamiento térmico de inhibidores de dos leguminosas sobre el grado de hidrólisis con un sustrato proteico sobre enzimas de camarón y comerciales

En la figura 5 se muestra el efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizado de proteína de pescado en la alimentación de salmones. La sustitución en 5 y 8% aumento significativamente, hasta 20%, el crecimiento de los peces en cultivo. No hubo diferencias entre los tratamientos. La figura 6 muestra el crecimiento específico de salmones alimentados con dietas conteniendo hidrolizados de proteína de pescado. Se observa que los organismos alimentados con hidrolizados al 5% presentan un mayor crecimiento específico que los del grupo control y los alimentados con hidrolizados al 8%. La figura 7 muestra el efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizados de pescado en la alimentación de camarón. Se observa que la alimentación con hidrolizados de proteína de pescado mejora el crecimiento de los camarones en un 30%, independientemente del grado de sustitución. Figura 8. Efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizados de proteína de pescado en factores de zootecnia en cultivo de camarón. El crecimiento relativo fue significativamente mejorado cuando los camarones fueron alimentados con diferentes porcentajes de hidrolizado de pescado, no habiendo diferencia entre los tratamientos. La mejora fue superior al 60%. La velocidad específica de crecimiento también fue mejorada pasando de 2 a 2.5 cuando los organismos se alimentaron con hidrolizado de proteína de pescado. La relación de conversión de alimento disminuyó significativamente, pasando de 4.5 a 3. La eficiencia de la proteína mejoró ligeramente y el único parámetro que no fue modificado fue la supervivencia. La gráfica 9 muestra el efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizado de proteína de pescado y de krill en crecimiento de camarón. En ambos casos, la sustitución mejoró el crecimiento de los camarones.

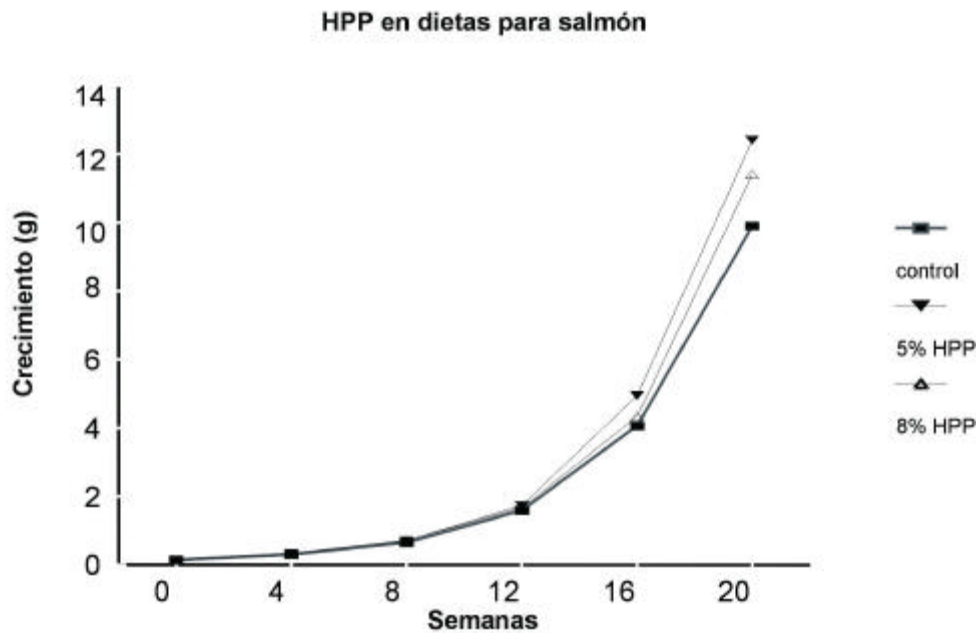


Figura 5. Efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizado de proteína de pescado en la alimentación de salmones

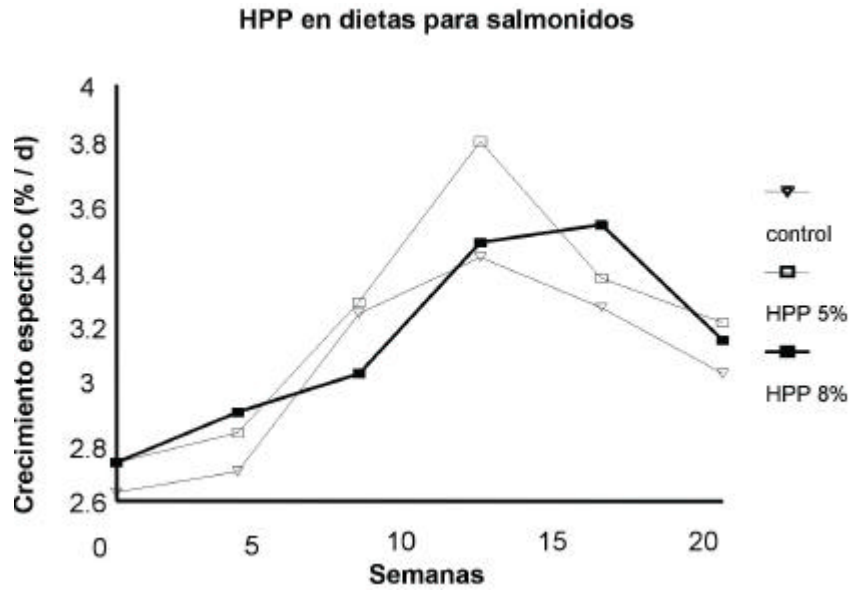


Figura 6. Crecimiento específico de salmones alimentados con dietas conteniendo hidrolizados de proteína de pescado

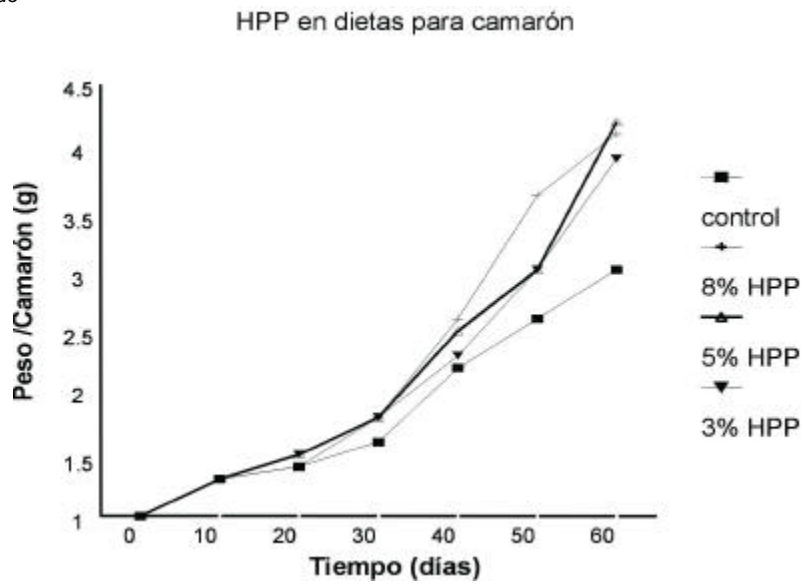


Figura 7. Efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizados de proteína de pescado en factores de zootecnia en cultivo de camarón

HPP en dietas para camarón

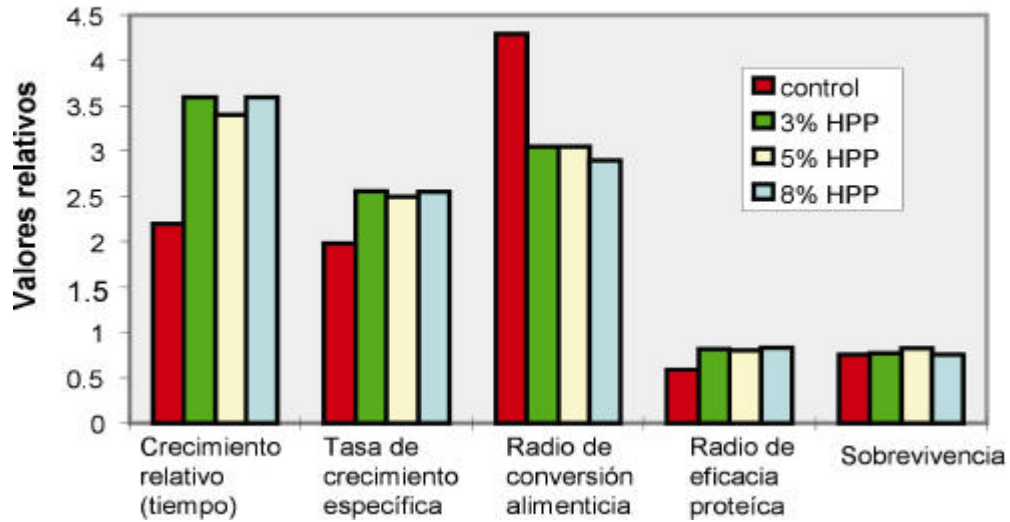


Figura 8. Efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizados de pescado en la alimentación de camarón.

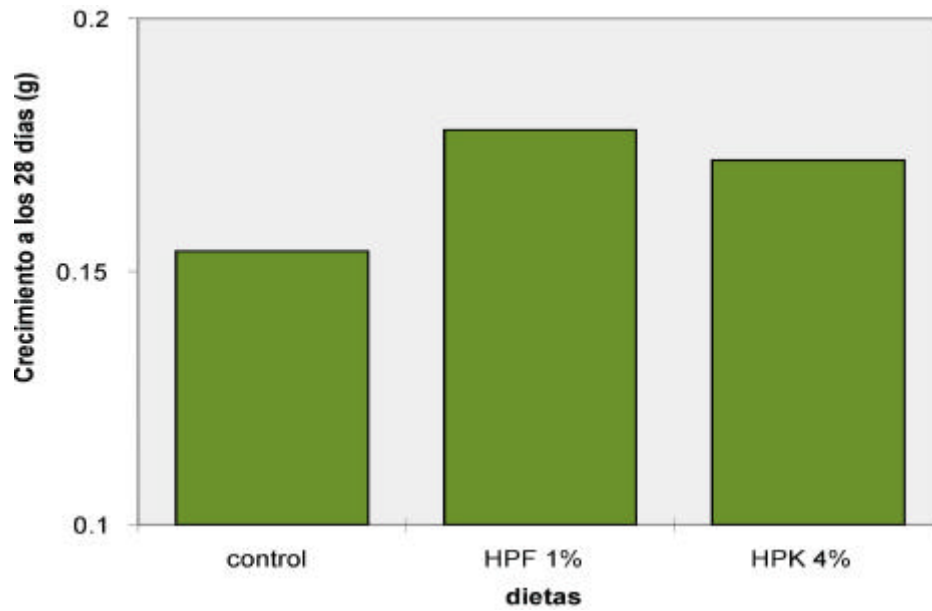


Figura 9. Efecto de la sustitución de harina de pescado por hidrolizado de proteína de pescado y de krill en crecimiento de camarón.

La técnica de evaluación de digestibilidad de proteína usando pH-stat y las enzimas de camarón ha sido validada y permite no solo evaluar la digestibilidad en ingredientes proteicos, sino en alimentos formulados conteniendo proteína, y detectar el efecto de inhibidores de proteinasas en los ingredientes proteicos, principalmente los de origen vegetal como la soya y otras leguminosas. Ingredientes proteicos de origen animal también suelen tener inhibidores de proteinasas, como la sangre de mamíferos, principalmente α 2macroglobulina, clara de huevo, principalmente cystatina y obomucoide. La técnica también detecta el efecto de tratamientos en la digestibilidad de una proteína, principalmente tratamientos de procesado como el calentamiento. Por lo que esta técnica pudiera ser usada como método de control de calidad en una planta de producción de insumos o de alimentos. Evaluando la digestibilidad de la proteína en materia prima, tanto para calidad de proteína como para la presencia de factores antinutricionales como inhibidores de enzimas digestivas, y de proceso, analizando el producto después de cada operación unitaria que involucre alta temperatura. Obviamente también es útil para control de calidad del producto final.

El uso de ingredientes proteicos de segunda generación, esto es, producidos con tecnología amigable para las propiedades funcionales y nutricias de un ingrediente proteico, según se muestra en los resultados presentados en este trabajo, mejoran los parámetros de cultivo de camarón y peces. Invariablemente son mejorados los parámetros de crecimiento, velocidad específica de crecimiento, se reduce el índice de conversión de alimento, y se mejora el índice de eficiencia proteica. El único parámetro no afectado es la supervivencia.

El hecho de que los organismos alimentados con hidrolizados de proteína tengan un mejor desempeño en crecimiento, aún con solo mejoras ligeras en el índice de eficiencia proteica abre la posibilidad de que estos insumos no solo participen como fuente de aminoácidos, sino que contengan algún compuesto que permita usar en forma más eficiente la proteína de la dieta. Al usar mejor la proteína, pasando por la liberación de aminoácidos en el tracto digestivo, la asimilación y la construcción de tejido con estos aminoácidos, el resultado final global es mejor crecimiento. Quedando por entender los fenómenos fisiológicos involucrados en esta observación macroscópica.

Referencias:

- Adler/Nissen, J.** 1986. Enzimic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A, Penaeid shrimp nutrition. In Fast, A.W. and Lester, J.** 1992. (Eds). Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier Science Publishers B.V. pp.535-567.
- Anderson, S.J., Lall, S.P., Anderson, D.M. and McNiven, M.A.** 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. Aquaculture. 115, 305-325.
- Anggawati, A. M., J. Heruwati, E.,** 1990. The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. Research Institute for Fish Technology, Palmerath, Jakarta .
- Babbitt, J. R., K. James, D. Pook, Ch. Sanders, J.,** 1994. Processes for improving the quality of white fish meal, in *45th Annual Meeting of Pacific Fisheries Technologists*, Kodiak, Alaska.
- Dimes, L.E., Haard, F.M.** 1994. Estimation of protein digestibility-I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 349-362. (1994).

- García-Carreño FL., Dimes N., Haard N.** 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. 214(1), 65-69. (1993).
- García-Carreño FL., Navarrete del Toro MA., Ezquerra M.** 1997. Digestive Shrimp Proteinases for the Evaluation of Protein Digestibility. I. The Effect of Proteinase Inhibitors in Protein Ingredients. *Journal of Marine Biotechnology*. 5, 36-40.
- Grabner, M.** An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture*, 48:97-110. (1985).
- Lan, C. C. and Pan, B.S.,** 1993. *in vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 109:59-70.
- Pederson, B. and Eggum, B.O.,** Prediction of protein digestibility an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *Tierphysiol, Tieternahrg u Futtermittelkde*, 49: 277-286. (1983).
- Papadopoulos, M. C.,** 1989. Effect of Processing on High-Protein Feedstuffs: A Review, *Biological Wastes*, 29, 123.
- Sudaryno A., Hoxey M.J., Kailis, S.g. and Evans L.H.** 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monod*. *Aquaculture*. 134, 313-323.
- Romero, J. C., E. Díaz, A. Reveco, M. Zaldivar, J.,** 1994. Evaluation of methods to certify the premium quality of Chilean fish meals, *Aquaculture*, 124, 351.