

## El Uso de Suplementos Enzimáticos en Dietas para Camarón

D. Allen Davis\*, W. Lyle Johnston and Connie R. Arnold

The University of Texas at Austin, Marine Science Institute, Fisheries and Mariculture Laboratory, 750 Channel View Drive, Port Aransas, Texas, USA 78373-5015, Tel: (512) 7 49 68 10, Davis@utmsi.utmsi.utexas.edu

\*Corresponding author

---

### Resumen

La sustentabilidad a largo plazo de la producción comercial de camarón es dependiente de las limitantes económicas y ambientales. Dado que el alimento es uno de los mayores costos asociados con las granjas de camarón y la fuente inicial de contaminantes, hay considerables presiones para reducir los costos de alimentación y minimizar los efectos contaminantes del alimento. Por adaptación de tecnologías y estrategias apropiadas de alimentación, la carga de nutrientes asociados a los sistemas de alimentación implementados puede ser minimizado. Una variedad de suplementos alimenticios, los cuales han demostrado incrementar la producción animal, podrían ser aplicados a alimentos para camarón. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron para evaluar el uso de proteasas grado alimenticio (FGP) en dietas prácticas para alimentos para camarón y la evaluación preliminar del uso de fitasa para liberar fósforo unido a fitina.

Diferentes niveles (0, 0.2, 0.4 g/ 100g dieta) de proteasa grado alimenticio fueron incorporados dentro de un alimento comercial para camarón para determinar valores aparentes de digestibilidad de proteínas. Los valores aparentes de digestibilidad de proteína (APD) fueron significativamente mejorados de 65.3% a 74.3% por la suplementación de FGP a 0.4 g/100g dieta, un incremento del 9% en APD sobre la dieta básica. Si esta proteína es disponible para la asimilación y crecimiento, el contenido proteico de la producción de dietas podría ser reducido o ingredientes menos digestibles podrían ser incorporados en las dietas sin reducciones en la proteína disponible. Para evaluar los efectos sobre el crecimiento y utilización alimenticia se realizó una prueba de 8 semanas de crecimiento. Diferentes niveles de FGP fueron suplementados para dietas prácticas conteniendo 15% o 30% de proteína. El suplemento de 0.4 g FGP/100 g dieta dio como resultado la disminución del crecimiento y utilización de alimento de camarones mantenidos con esta dieta comparados con que se les ofreció la dieta basal, sin suplemento de enzimas. Estos resultados podrían indicar que niveles altos de esta enzima pueden impactar negativamente el desarrollo del camarón y que bajos niveles no tienen influencia significativa sobre el crecimiento o utilización del alimento.

En el segundo componente de esta investigación una dieta básica práctica, previamente demostrada a ser deficiente en disponibilidad de fósforo, fue usada para evaluar el uso de la enzima fitasa para liberar fósforo unido al fitato. Aunque la dieta basal fue deficiente en fósforo disponible, la suplementación de la fitasa resultó en un cambio positivo en ganancia de peso y eficiencia de conversión alimenticia. Esto indica que la fitasa puede liberar fósforo unido al fitato justificando posteriores investigaciones en alimentos prácticos para camarón.

Davis, D. A., W. L. Johnston y C. R. Arnold. 2000. El uso de suplementos enzimáticos en dietas para camarón. pp 452-462 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.

## Introducción

Desde la década pasada, la acuicultura ha sido el sistema de producción alimenticia de crecimiento más rápido del mundo, con producción total de peces y crustáceos incrementándose de 4.67 millones de toneladas métricas (mmt) en 1984 a 15.80 mmt en 1995 (Tacon, A.G. J., 1997). Aunque muchas especies, crecen utilizando sistemas de producción extensivo, la industria esta cambiando hacia el sistemas alimenticios intensivos y/o producción de especies carnívoras de alto valor. Asociado con este cambio esta una confianza sobre compuestos alimenticios, incrementando el potencial para el impacto ambiental del sistema de producción.

Nitrógeno, fósforo, y desechos orgánicos de los alimentos son los mayores factores que contribuyen a la contaminación ambiental de la acuicultura (Rijn y Shilo, 1989; Folke y Kautsky, 1991; Boyd y Musig, 1992). Como la fuente inicial, la manipulación del alimento es el mas directo y efectivo medio para reducir los contaminantes (Cho *et al*, 1991). Alimentos de bajo nivel contaminante deben ser diseñados para incrementar la utilización del alimento por las especies cultivadas y minimizar las perdidas de nutrientes al ambiente. Este objetivo puede ser alcanzado por el incremento de la digestibilidad de nutrientes y reducción de desechos fecales.

Incrementando la digestibilidad del alimento no solamente reduce la contaminación ambiental, sino también bajaría el costo total de producción por la reducción de gasto de nutrientes por unidad de producción. Además para la selección de ingredientes altamente digestibles, la utilización de suplementos enzimáticos diseñados para mejorar la digestibilidad de materiales alimenticios ha sido exitosamente aplicado en alimentos para organismos terrestres (Wenk, 1992) y acuaticos. Ejemplos del uso de enzimas en alimentos para animales acuáticos incluye: alimentación de la carpa común con un residuo de soya el cual ha sido predigerido por papaina, una proteasa aislada del látex de *Carica papaya* (papaya) (Wong *et al*, 1996); la inclusión de un suplemento de una mezcla multienzimática exógena un alimento para *P. monodon* (Buchanan *et al*, 1997); el suplemento de dietas practicas para el róbalo rayado *Morone saxatilis* con una fitasa comercial (Hughes y Soares, 1998); modificación de la relación de enzimas digestivas (amilasa/proteasa) en *P. japonicus* a través del suplemento de enzimas en la dieta (Maugle *et al*, 1983a); y el pretratamiento de harina de soya con fitasa previo a su uso en las dietas de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, (Cain y Garling, 1995). Esos estudios indican que la utilización de suplementos enzimáticos en los alimentos o ingredientes alimenticios tiene el potencial de mejorar la utilización de nutrientes dietéticos, activar zimogeno(s) endógeno(s) y proveer enzimas que no están normalmente presentes en el sistema digestivo del animal cultivado. Consecuentemente, los objetivos de esta investigación fueron 1) Evaluar los efectos de una proteasa grado alimenticio (FGP) sobre la digestibilidad aparente de proteína de un alimento comercial para camarón 2) Evaluar el crecimiento y utilización de alimento, de juveniles de camarón, de una dieta práctica formulada con niveles de FGP 3) Evaluar el crecimiento y la utilización de alimento, de juveniles de camarón, con una dieta deficiente de fósforo suplementada con fitasa.

## Materiales y Métodos

### Digestibilidad de dietas comerciales complementadas con una proteasa general.

Los valores de proteína aparente y digestibilidad de materia seca fueron determinados basados en la metodología indirecta utilizando oxido crómico como un marcador inerte. La dieta basal consistió de (como g/100 g peso seco) 96.1 molido comercial formulado para el camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, y obtenida de Rangen Inc. (Buhl, ID); 2.5, aceite de pescado (menhaden fish oil);

1.0, óxido crómico; y 0.4, tierra de diatomeas. Las dietas de prueba fueron producidas por sustitución de la tierra de diatomeas en la dieta basal con el apropiado nivel (0, 0.2 o 0.4 g/100 g) de Bromelain FG (ENZECO<sup>7</sup>). ENZECO<sup>7</sup> Bromelain FG es una proteasa grado alimenticio (FGP), conteniendo enzimas proteolíticas encontradas en varias especies de la familia Bromeliceae. Esta FGP fue seleccionada porque la proteasa permanece atrapada con las fibras del tallo de la piña y por lo tanto debe ser menos susceptible a lixiviación en el agua. Los ingredientes dietéticos fueron homogeneizados en una mezcladora de alimentos (Hobart Corp., Troy, OH) por treinta minutos. Después del mezclado, se adicionó agua caliente a la masa para formar una pasta de consistencia apropiada para el peletizado. Cada dieta fue peletizada utilizando un molino de carne con un dado de 3 mm, y fue colocada en un horno (< 45 °C) por 2 h seguida por el secado por toda la noche (temperatura ambiente) para alcanzar un contenido final de humedad de 8-10%. Los alimentos fueron molidos y tamizados para obtener el tamaño apropiado para el camarón, entonces almacenados bajo refrigeración hasta su uso. El contenido proteico de la dieta fue confirmado de ser 39.9% por el análisis de Kjeldahl. Las pruebas de digestibilidad siguiendo los similares métodos a los reportados por Davis y Arnold (1993).

*P. vannamei* (peso promedio 15.4 g) se mantuvo en un sistema semi-cerrado, con sistema de recirculación, consistente de tanques cuadrados (75 L), bomba de circulación, filtros de arena y filtro biológico. Los parámetros ambientales fueron mantenidos a la temperatura, 26 C; salinidad, 30 ppt; oxígeno disuelto, 6.2 ppm. Cada dieta fue proporcionada en cuatro replicas de tanques de camarón (8 camarones por tanque) para un periodo de acondicionamiento de 17-días seguido por un periodo de colecta de tres días. Durante el periodo de colecta se siguió el siguiente procedimiento. En la mañana los tanques fueron sifoneados y el ciclo de alimentación iniciado. Los camarones se alimentaron 35-45 minutos después de que la heces fueron colectadas por sifoneo manual dentro de un tamiz colector (48 *Fm*), seguido por un lavado con agua destilada. Después las heces fueron colectadas, el alimento no comido fue removido del tanque y se repitió el proceso de alimentación. Durante el periodo de colecta, la primera colecta de la mañana fue desechada, con las siguientes 4-5 colectas/día se juntaron por tanque por un periodo de tres días. Las muestras fecales extraídas fueron secadas en el horno (100 °C) y almacenadas a -15 C hasta su análisis.

El nitrógeno amoniacal total (TAN), nitrógeno de nitritos y el pH fue monitoreado bi-semanalmente por métodos espectrofotométricos (Spotte, 1979) y pH meter, y fueron mantenidos dentro de los límites aceptables. Los análisis bioquímicos de las dietas probadas y de cada muestra fecal se llevó a cabo por triplicado. El óxido crómico fue medido por el método de digestión ácida húmeda (McGinnis y Kasting, 1964) y el nitrógeno total determinado por el método micro-Kjeldahl (Ma y Zuazago, 1942). Se utilizó el método de análisis de varianza de una vía para determinar la significancia ( $P < 0.05$ ) de los efectos del tratamiento y la prueba de rango múltiple de Student-Newman-Keuls (Steel y Torrie, 1980) para determinar diferencias entre las medias de los tratamientos. Los análisis estadísticos fueron desarrollados usando el sistema SAS para Windows<sup>TM</sup> (v 6.11, SAS Institute Inc., Cary, N.C.).

### **Evaluación de la proteasa sobre el crecimiento y utilización alimenticia.**

Siguiendo un periodo de aclimatación de ocho días, el camarón se seleccionó a una talla uniforme (peso inicial 0.25 g/camarón) y colocados en cuatro tanques réplicas por tratamiento dietético a una densidad de 8 camarones por tanque. Se llevó a cabo una prueba de ocho días de crecimiento para evaluar el efecto de ENZECO<sup>7</sup> Bromelain FG sobre el crecimiento y la retención de proteína neta aparente para *P. vannamei*. Dos niveles de proteína (15% y 30%) y cuatro niveles de suplemento enzimático (0, 0.1, 0.2, y 0.4 g FGP/100g alimento) fueron evaluados usando un diseño factorial 2 x 4. Las dietas de prueba (Tabla 1) fueron producidas por sustitución de un relleno no nutritivo en la dieta basal por 0, 0.1, 0.2, y 0.4 g de ENZECO<sup>7</sup> Bromelain FG/100g peso seco del alimento. Previo a

su uso, los ingredientes fueron molidos con un molino de martillos de laboratorio usando una malla de 24 cuadros (0.609 mm de diámetro de cuadro). Los ingredientes dietéticos fueron homogeneizados en una mezcladora de alimentos (Hobart Corp., Troy, OH) por treinta minutos. Después de la mezcla, se le añadió agua tibia en la masa hasta que alcanza una apropiada consistencia para el peletizado. Cada dieta fue peletizada utilizando un molino de carne con un dado de 3mm y puesto en el horno (< 45 °C) por 2 h seguido por el secado durante toda la noche (a temperatura ambiente) para alcanzar el contenido de humedad final de 8-10%. El alimento fue molido y tamizado para obtener el tamaño apropiado para el camarón, después fueron almacenados bajo refrigeración hasta su uso.

Tabla 1. Composición de dietas probadas utilizadas para evaluar un grado de protea grado alimenticio (g/100g peso seco).

	15% proteína				30% proteína			
Harina de pescado (Menhaden) <sup>a</sup>	8.50	8.50	8.50	8.50	17.00	17.00	17.00	17.00
Harina de soya <sup>b</sup>	17.00	17.00	17.00	17.00	35.50	35.50	35.50	35.50
Solubles de pescado <sup>a</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Aceite de pescado (Menhaden) <sup>c</sup>	2.80	2.80	2.80	2.80	3.80	3.80	3.80	3.80
Harina de trigo <sup>d</sup>	64.98	64.98	64.98	64.98	36.98	36.98	36.98	36.98
Lecitina de soya <sup>e</sup>	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
Premezcla de minerales traza <sup>f</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Premezcla de vitaminas <sup>g</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Stay C <sup>h</sup>	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Cefkaphos <sup>i</sup>	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400
Bromelin <sup>j</sup>	0	0.1	0.2	0.4	0	0.1	0.2	0.4
Celulosa <sup>d</sup>	0.4	0.3	0.2	0	0.4	0.3	0.2	0

<sup>a</sup> Selección especial™, Zapata Haynie Corporation, Hammond, Louisiana, USA.

<sup>b</sup> Extraído con solvente, Producers Cooperative, Bryan, Texas, USA.

<sup>c</sup> Zapata Haynie Corporation, Reedville, Virginia, USA.

<sup>d</sup> United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, USA.

<sup>e</sup> Aqualipid 95, Central Soya Chemurgy Division, Fort Wayne, Indiana, USA.

<sup>f</sup> Composición de una premezcla de minerales traza (g kg<sup>-1</sup> mix): Cobalto Clorhidro, 0.04; Sulfato pentahidratado cuprico, 5.50; Sulfato Ferroso, 20.00; Sulfato heptahidratado de magnesio, 283.98; sulfato de Manganeso monohidratado, 6.50; yoduro de potasio, 0.67; Selenito de Sodio, 0.10; Sulfato de Zinc heptahidratado, 131.93; celulosa, 551.28.

<sup>g</sup> Composición de una premezcla de vitaminas (g kg<sup>-1</sup> mezcla): Tiamina-HCl, 4.95; Riboflavina, 3.83; Piridoxina-HCl, 4.00; Ca-Pantotenato, 10.00; Acido nicotínico, 10.00; Biotina, 0.50; Acido fólico, 4.00; Vitamina B<sub>12</sub>, 0.05; Cloruro de Colina, 100.00; Inositol, 25.00; Vitamina A-acetato (20,000 IU/g), 8.00; Vitamina D (400,000 IU/g), 0.50; Vitamina E-acetato (250 IU/g), 80.00; Menadiona, 0.5; celulosa, 748.68.

<sup>h</sup> Stay C, L-Ascorbyl-2-Polyfosfato, Hoffman-LaRouche, Inc., Nutley, New Jersey, USA.

<sup>i</sup> Fosfato de calcio grado alimenticio, BASF Corporation, Mount Olive, NJ, USA

Las pruebas alimenticias se realizaron en un sistema de circulación semi cerrado que consistió de 32 tanques cuadrados de 75 L, bomba para la circulación, filtro de arena, filtro biológico, y aeración. El sistema de agua fue intercambiado por agua de mar prefiltrada (<50 Fm) tratada con ozono a un flujo de 4 L/hr. La salinidad, temperatura, y oxígeno disuelto fue medido diariamente. Los parámetros de calidad del agua (TAN, nitritos y pH) fue medido bisemanalmente usando métodos espectrofotométricos (Spotte, 1979) y un pH metro. El foto periodo fue controlado a 12 h luz y 12 h oscuridad. Los parámetros de calidad del agua medidos diariamente fueron como sigue (promedio " desviación estándar): temperatura, 27.3 " 1.2 °C; oxígeno disuelto, 5.7 " 0.4 mg/L; salinidad, 30 " 2 ppt. TAN, nitritos y niveles de pH fueron determinados para ser 0.028 " 0.034 ppm, 0.006 " 0.003 ppm, y 7.9 " 0.1, respectivamente.

Al final del experimento, el camarón fue pesado para obtener un promedio del peso final. Una muestra aleatoria de tres camarones de cada tanque fueron colectados, homogeneizados, y congelados para los subsecuentes análisis proximales. Todos los análisis bioquímicos fueron llevados a cabo por triplicado. Porciones representativas de muestras fueron secados para un peso constante y mantenidos a 90 °C. El contenido proteico fue determinado por el método micro-Kjeldahl (Ma y Zuazago, 1942). Los valores de eficiencia alimenticia estimados (EFE) fueron calculados para cada tratamiento como la proporción de peso ganado por unidad de peso seco del alimento propuesto (ganancia / alimento seco x100). La eficiencia de la conversión proteica (PCE) fue calculada como los gramos de proteína ganada por gramos de proteína alimenticia (proteína ganada/ proteína ofrecida x 100). Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías para determinar las diferencias significativas debido a los principales efectos y sus interacciones. La prueba de rango múltiple Student-Neuman Keul=s (Steel y Torrie, 1980) se utilizó para examinar las deferencias significativas (P < 0.05) entre las medias de los tratamientos.

### **Efectos del suplemento de fitasa sobre el crecimiento de camarón**

Una segunda prueba de alimentación fue diseñada como una evaluación preliminar de la capacidad de fitasa para liberar fósforo unido as fitato. Una dieta basal, que ha demostrado ser deficiente en fósforo (Davis y Arnold, 1998), y dos dietas repletas utilizando fuentes de fósforo grado alimenticio fueron preparadas utilizando los procedimientos descritos previamente. Las cuatro dietas consisten de una dieta basal complementada con 0.25g/100g Natuphos7 (600 FTU/g, BASF Corporation, New Jersey) reemplazando el material relleno (Tabla 2). La actividad de la dieta basal y la dieta suplementada con Natuphos7 fue evaluada para la actividad de la fitasa (FTU, definido como la cantidad de enzima la cual libera 1 micro-mol de fósforo inorgánico minuto<sup>-1</sup> de 0.0051 mol L<sup>-1</sup> fitato de sodio a pH 5.5 y 37 °C). Los análisis fueron llevados a cabo por BASF Corporation (Wyandotte, Michigan) e indicaron que la dieta basal contenía 281 FTU/kg y la dieta suplementada contenía 1,919 FTU/kg.

Los procedimientos experimentales fueron como se describió anteriormente, excepto que previo al comienzo del experimento el camarón fue alimentado con la dieta basal por un periodo de pre acondicionamiento de 7 días. Las dietas de prueba fueron ofrecidas en cuatro tanques replica de camarón (8 camarones por tanque; peso medio inicial  $\pm$  desviación estándar, 0.30  $\pm$  0.017g). Durante los 56 días de la prueba de crecimiento el camarón recibió un total de 9.8g alimento seco por camarón. La temperatura del agua, oxígeno disuelto y salinidad fueron mantenidos a 28.7  $\pm$  1.0 C, 5.9  $\pm$  0.5 ppm y 31.6  $\pm$  2.0 ppt, respectivamente. El nitrógeno total de amonio, nitritos y pH fueron medidos dos veces a la semana y mantenidos a 0.04  $\pm$  0.02 ppm, 0.08  $\pm$  0.11 ppm y 7.8  $\pm$  0.22, respectivamente. A la conclusión de la prueba de crecimiento, el peso ganado, sobrevivencia, y EFE (basado en el alimento suministrado) fueron determinados. El análisis de varianza de una vía fue

utilizado para determinar la significancia ( $P < 0.05$ ) del efecto de los tratamientos y la prueba de Dunnett=s T para determinar las diferencias significativas del control o la dieta basal (Steel y Torrie, 1980).

Tabla 2. Composición de las dietas probadas utilizadas para evaluar una dieta complementada con fitasa (g/100g peso seco).

	Basal	Phytase	0.25% P	0.375% P
Harina de anchoveta <sup>1</sup>	20.0	20.0	20.0	20.0
Harina de soya <sup>2</sup>	33.0	33.0	33.0	33.0
Solubles de pescado <sup>3</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Aceite de pescado Menhaden <sup>4</sup>	3.8	3.8	3.8	3.8
Harina de trigo <sup>5</sup>	35.9	35.9	35.9	35.9
Lecitina de soya <sup>6</sup>	1.3	1.3	1.3	1.3
Premezcla de minerales traza <sup>7</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla de vitaminas <sup>8</sup>	2.0	2.0	2.0	2.0
Vitamina C (25% activa) <sup>9</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
NaCl <sup>5</sup>	0.3	0.3	0.3	0.3
Natuphos <sup>7 10</sup>		0.25		
Cefkaphos <sup>7 10</sup>			1.0	
Dynafos <sup>7 11</sup>				2.025
Tierra de diatomeas <sup>5</sup>	2.1	1.85	1.0	0.075
fósforo total	0.98	1.35	1.23	1.35

<sup>1</sup> Ralston Purina International, Checkerboard Square, St. Louis, Missouri, USA.

<sup>2</sup> Extraído con solvente, Producers Cooperative, Bryan, Texas, USA.

<sup>3</sup> Zapata Haynie Corporation, Hammond, Louisiana, USA.

<sup>4</sup> Zapata Haynie Corporation, Reedville, Virginia, USA.

<sup>5</sup> United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, USA.

<sup>6</sup> Aqualipid 95, Central Soya Chemurgy Division, Fort Wayne, Indiana, USA.

<sup>7</sup> Composición de la premezcla de minerales traza (g kg<sup>-1</sup> mezcla): Cloruro de Cobalto, 0.04; Sulfato Cuprico pentahidratado, 5.50; Sulfato ferroso, 20.00; sulfato de Magnesio heptahidratado, 283.98; Sulfato de Manganese monohidratado, 6.50; Yoduro de Potasio, 0.67; Selenito de sodio, 0.10; Sulfato de Zinc heptahidratado, 131.93; Alfa-celulosa, 551.28.

<sup>8</sup> Composición de la premezcla de vitaminas (g kg<sup>-1</sup> mix) :Tiamina-HCl, 4.95; Riboflavina, 3.83; Piridoxina-HCl, 4.00; Ca-Pantotenato, 10.00; Acido nicotínico, 10.00; Biotina, 0.50; Acido fólico, 4.00; Vitamina B<sub>12</sub>, 0.05; Cloruro de Colina, 100.00; Inositol, 25.00; Vitamina A-acetato (20,000 IU/g), 8.00; Vitamina D (400,000 IU/g), 0.50; Vitamina E-acetato (250 IU/g), 80.00; Menadiona, 0.5; celulosa, 748.68.

<sup>9</sup> Stay C, L-Ascorbyl-2-Polifosfato, Hoffman-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey, USA.

<sup>10</sup> Fósforo Grado alimenticio, principalmente fosfato monobásico cálcico, BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, USA.

<sup>11</sup> Fósforo Grado alimenticio, principalmente fosfato cálcico dibásico, Mallinckrodt Feed Ingredients, Mundelein, Illinois, USA.

## Resultados y Discusion

Las pruebas de digestibilidad fueron diseñadas para inicialmente evaluar los efectos de diferentes niveles de proteasa alimenticia (FGP) sobre los coeficientes de digestibilidad para *P. vannamei*. Los resultados de esta prueba son resumidos en la Tabla 3. Aunque no hubo diferencias significativas en los valores de digestibilidad aparente de materia seca (ADMD), hubo un incremento general en los valores de ADMD correspondiendo con la suplementación de FGP. Esta respuesta es en parte, debida a la substitución de relleno inerte con el FGP. Diferencias significativas en los valores de APD

corresponden a los incrementos en el suplemento dietético. Para camarón alimentados con la dieta basal suplementada con 0.4 g FGP hubo un incremento de 9 % en APD observado sobre la dieta basal.

Tabla 3. Digestibilidad aparente de materia seca (ADMD) y digestibilidad de proteína (APD) valores para *P. vannamei* ofreciendo una dieta básica y dieta experimental<sup>b</sup> conteniendo variados niveles de ENZECO7 Bromelain FG.

ENZECO7 Bromelain FG	ADMD <sup>c</sup>	APD <sup>c</sup>
0	53.2 <sup>z</sup>	65.3 <sup>x</sup>
0.2	54.2 <sup>z</sup>	67.6 <sup>x</sup>
0.4	61.1 <sup>z</sup>	74.3 <sup>z</sup>
PSE <sup>d</sup>	2..34	11.45

<sup>a</sup> Dieta basal conteniendo g/100g peso seco: 96.1, molido comercial ; 2.5, Aceite de pescado (menhaden); 1.0, Oxido crómico y 0.4, tierra diatomeas.

<sup>b</sup> Los tratamientos dietéticos consistieron de la dieta basal modificada que contiene el complemento al nivel indicado, reemplazando la tierra de diatomeas.

<sup>c</sup> Los datos representan el promedio de cuatro replicas. Valores promedio con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ) de cada uno.

<sup>d</sup> Error estándar.

Esos resultados podrían indicar que las enzimas proteolíticas pueden estar limitando la digestibilidad de proteínas en el camarón mantenido con un alimento comercial para camarón y que el incremento en los valores APD pueden ser obtenidos a través del uso de suplementos dietéticos. Maugle *et al.*, (1983a), demostraron el incremento de la proteasa y la actividad zimogena en el hepatopancreas del camarón, *P. japonicus*, alimentado con dietas alimenticias suplementadas con tripsina bovina microencapsulada. Maugle *et al.*, (1983b), reportaron un incremento en la digestión de carbohidratos por la adición de amilasa para dietas de camarón. Si el suplemento de enzimas exogenas resulta un incremento en la actividad enzimatica y un incremento en la digestión de nutrientes, un mayor porcentaje de los nutrientes pueden ser disponibles para la asimilación y crecimiento. Por lo tanto, el costo alimenticio podría ser reducido por la incorporación de ingredientes de baja digestibilidad menos costosos y/o reduciendo el contenido proteico de la dieta. En la formulacion de dietas bajas en contaminantes, niveles de proteína reducidos en los alimentos e incremento en los valores de APD podrían producir reducciones significativas en el nitrógeno que entra en el sistema de cultivo. Aunque esos resultados son alentadores, cualquier efecto adverso del suplemento enzimático sobre el crecimiento o retención de nutrientes de el camarón deber ser evaluado.

Para determinar los efectos de la suplementacion de FGP en una dieta práctica para camarón, dos niveles de proteínas (15 y 30%) y cuatro niveles de FGP (0.0, 0.1, 0.2, y 0.4 g/100g dieta) fueron evaluados. Los resultados de estas prueba de crecimiento son resumidos en la Tabla 4. El análisis de varianza de dos vías indico que hubo diferencias significativas debido a los principales efectos (proteína y nivel de FGP), pero no debido a sus interacciones para el peso final, EFE, y PCE del camarón. Consecuentemente los datos fueron separados por niveles de proteína para el análisis final. No hubo diferencias significativas debido a los efectos principales o a las interacciones para los datos de sobrevivencia.

Para los camarones alimentados con la dieta alimenticia conteniendo 15% de proteína, los pesos finales fueron de 3.8 g a 3.1 g para camarones alimentados con la dieta basal y la dieta conteniendo

0.4 g FGP/100 g, respectivamente. Las dietas restantes produjeron pesos intermedios y no fueron significativamente diferentes de las otras dietas. Una respuesta similar fue observada para los valores de EFE y PCE. Con respecto a los camarones alimentados con la dieta con 30 % de proteína, el rango de los pesos finales va desde 4.6 g a 3.9 g para camarones alimentados con la dieta basal y la dieta conteniendo 0.4 g FGP/100 g, respectivamente. Los valores de eficiencia alimenticia estimados para el camarón mantenido con la dieta basal complementada con 0.4 g FGP/100g fue significativamente menor que lo observado para la dieta basal conteniendo 0.1 y 0.2 g FGP/100 g dieta. Aunque los valores de PCE fueron mas bajos para el camarón al que se le proporciono la dieta basal conteniendo 0.4 g FGP/100 g dieta, no hubo diferencias significativas observadas entre los tratamientos dietéticos.

Tabla 4. Respuesta de *P. vannamei* después de 8 semanas de dietas alimenticias conteniendo varios niveles de proteína y proteasa grado alimenticio (FGP)<sup>1</sup>.

Proteína	FGP	Peso final	Sobrevivencia	EFE <sup>2</sup>	PCE <sup>3</sup>
15	0	3.8 <sup>z</sup>	96.9 <sup>z</sup>	35.8 <sup>z</sup>	37.8 <sup>z</sup>
15	0.1	3.4 <sup>yz</sup>	100 <sup>z</sup>	31.9 <sup>yz</sup>	36.0 <sup>yz</sup>
15	0.2	3.5 <sup>yz</sup>	96.9 <sup>z</sup>	33.0 <sup>yz</sup>	34.7 <sup>yz</sup>
15	0.4	3.1 <sup>y</sup>	96.9 <sup>z</sup>	28.7 <sup>y</sup>	30.5 <sup>y</sup>
PSE <sup>4</sup>		0.13	2.70	1.37	1.67
30	0	4.6 <sup>z</sup>	100 <sup>zz</sup>	44.3 <sup>z</sup>	24.5 <sup>z</sup>
30	0.1	4.4 <sup>z</sup>	96.9 <sup>z</sup>	42.6 <sup>z</sup>	24.7 <sup>z</sup>
30	0.2	4.4 <sup>z</sup>	100 <sup>z</sup>	42.6 <sup>z</sup>	24.6 <sup>z</sup>
30	0.4	3.9 <sup>y</sup>	100 <sup>z</sup>	37.0 <sup>y</sup>	21.5 <sup>z</sup>
PSE		0.14	1.56	1.40	0.89

<sup>1</sup>Promedio de cuatro réplicas. Números dentro de la misma columna y nivel de proteína con diferente superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05).

<sup>2</sup>EFE, estimación de eficiencia alimenticia = ganancia en peso/alimento ofrecido x 100.

<sup>3</sup>PCE, eficiencia de conversión proteica = ganancia en proteína /proteína ofrecida x 100.

<sup>4</sup>PSE, error estandar.

La respuesta negativa al nivel mas alto de suplementacion pudiera indicar un efecto adverso de la enzima sobre el desarrollo del camarón. La inclusion recomendada por el fabricante para ENZECO7 Bromelain FG en dietas para camarón es de 0.2 g /100g dieta. Bajo las condiciones de estos experimentos, el suplemento de FGP a 0.1 o 0.2 g/100g dieta no resultó en un cambio significativo en el crecimiento del camarón o la utilizacion de alimento. Con dos veces el nivel recomendado (0.4 g FGP/100 g dieta) el peso final del camarón, EFE y los valores de PCE fueron significativamente mas bajos que aquellos observados para el camarón alimentado con la dieta basal. La respuesta pobre podria ser debido a los cambios de palatabilidad en la dieta o lixiviación de nutrientes predigeridos desde el alimento.

Buchanan *et al*, (1997), demostró un incremento de ganancia en peso por la adición de un suplemento multi-enzimático a dietas de camarón conteniendo altos niveles (64 g/100 g dieta) de harina de canola. Maugle *et al*, (1983b) reportó incremento en el crecimiento con el aumento del suplemento de amilasa. En ambos reportes, los incrementos en ganancia de peso parecen ser relacionados por el incremento de la disponibilidad de energía del componente carbohidrato de la dieta. Las diferencias en respuestas para la prueba actual de crecimiento debería ser atribuido a las diferencias de especies, formulacion dietética, y/o función enzimática.



La segunda prueba de crecimiento fue diseñada para evaluar preliminarmente el uso de la fitasa para liberar fitato vinculado a fósforo. El fitato es una sal mineral del ácido fítico el cual es encontrado en una variedad de ingredientes alimenticios de origen vegetal. El fitato fosfórico es o no disponible, o pobremente utilizado por el camarón e inhibe la disponibilidad del zinc (Davis *et al*, 1993, Civera y Guillaume, 1989). La suplementación de fitasa para la dieta ha encontrado liberar fósforo unido a fitato en alimentos para peces (Ketola, 1994; Cain y Garling, 1995; Storebakken *et al*, 1996; Jackson *et al*, 1996; Hughes y Soares, 1998), pero no ha sido evaluado con el camarón.

En el presente estudio una dieta basal práctica, la cual ha sido previamente determinada para estar deficiente en fósforo (Davis y Arnold, 1998), fue suplementada con una fuente comercial de fitasa o niveles elevados de fosfato de calcio originado de uno u dos fuentes de fósforo de grado alimenticio. Los resultados en términos de crecimiento, sobrevivencia y EFE se presentan en la Tabla 5. Diferencias significativas entre tratamientos dietéticos fueron observados para biomasa final, porcentaje de peso ganado y valores de EFCE. La sobrevivencia del camarón alimentado con la dieta basal fue el mas pobre y la sobrevivencia del camarón alimentado con la dieta basal suplementada con fitasa fue intermedia; sin embargo, no hubo diferencias significativas detectadas entre los tratamientos dietéticos. La ganancia en peso para el camarón alimentado con la dieta basal fue pobre (5.30 vs. 6.01 a 6.36g), mientras el porcentaje de peso ganado fue solamente significativo mejorado por la adición de 0.250 g P/100g originado desde Cefkaphos<sup>7</sup>. La biomasa final, una medida que combina sobrevivencia y ganancia en peso, indica que ambos suplementos de fósforo resultaron en incrementos significativos en biomasa comparado a la dieta basal. Similarmente los valores de EFE para camarones alimentados con los dos suplementos de fósforo fueron significativamente mejorados con respecto a los camarones alimentados con la dieta basal confirmando que la dieta basal fue deficiente en fósforo.

Tabla 5. Respuesta de *P. vannamei* a las dietas probadas a los 56 días del ensayo de crecimiento.

Suplemento de fósforo	Biomasa (g)	Ganancia en peso (%)	Sobrevivencia (%)	EFE (%) <sup>1</sup>
0	24.3	1736	56.25	35.9
Fitasa	34.8	1987	68.75	41.5
0.250-A	44.8*	2154*	84.38	42.1*
0.375-B	44.5*	1924	87.50	45.5*
PSE	3.5	108	8.60	1.6

<sup>1</sup>EFE, eficiencia de conversión alimenticia estimada = ganancia en peso/alimento ofrecido\*100.

A= Cefkaphos<sup>7</sup>

B= Dynafos<sup>7</sup>

\* Indica una significativa diferencia del control (dieta basal sin complemento de fósforo) 1 Determinada por la prueba de Dunnett=s T.

En términos de biomasa final, porcentaje de ganancia de peso, sobrevivencia y valores de EFE, La suplementación de fitato a la dieta basal resultó con un mejoramiento en esos parámetros. Esta respuesta fue intermedia para aquellos de la dietas basales y dietas repletas. Aunque estos datos no son robustos estadísticamente, la respuesta observada debería indicar que la fitasa puede liberar fósforo del fitato y/o prevenir la unión del fósforo originado de otros ingredientes. Consecuentemente, evaluaciones anteriores del uso de fitasas en alimentos para camarón es garantizado.

## Conclusiones

Bajo las condiciones reportadas, el uso de FGP significativamente mejoró APD de un alimento comercial para camarón conteniendo 40% proteína. Sin embargo, la evaluación del suplemento enzimático en dietas para camarón prácticas definidas, conteniendo 15% o 30% de proteína, no dio resultados de mejoramiento en crecimiento o utilización de alimento. Basado en esos resultados, FGP no parece aumentar el crecimiento y la utilización de alimento en un alimento de alta calidad para camarón. Sin embargo, el uso de fitasa en dietas de formulación práctica que es deficiente en fósforo parece incrementar la disponibilidad de fósforo en la dieta, como es demostrado por el incremento en el crecimiento y eficiencia de conversión de alimento estimada.

Aunque los resultados de las pruebas alimenticias con FGP no resultó en mejoramientos en la utilización de alimento, los resultados con fitasa fueron alentadores. La literatura actual indica que, bajo ciertas circunstancias, suplementos enzimáticos tal como la amilasa, papaina, tripsina, y suplementos multi-enzimáticos han producido resultados positivos. En general, los resultados parecen ser mejores en dietas conteniendo bajos ingredientes digestibles y/o ingredientes para el cual las enzimas digestivas endógenas son inadecuadas. Otra investigación en el uso de enzimas exógenas como suplementos alimenticios o como pretratamiento de materiales alimenticios es garantizado.

## Referencias:

- Boyd, C.E. and Y. Musig.** 1992. Shrimp pond effluents: observations of the nature of the problem on commercial farms. pp. 195-197. In J. Wyban, editors. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA.
- Buchanan, J., H.Z. Sarac, D. Poppi and R.T. Cowan.** 1997. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. *Aquaculture* 151: 29-35.
- Cain, K.D. and D.L. Garling.** 1995. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. *The Progressive Fish-Culturist* 57: 114-119.
- Cho, C.Y., J.D. Hynes, K.R. Wood and H.K. Yoshida.** 1991. Quantitation of fish culture wastes by biological (nutritional) and chemical (limnological) methods; the development of high nutrient dense (HND) diets. Pages 37-50. In C.B. Cowey and C.Y. Cho, editors. *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 1990; 275 p.
- Civera, R. and J. Guillaume.** 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 77:145-156.
- Davis, D.A. and C.R. Arnold.** 1998. Bioavailability of feed grade calcium phosphate incorporated into practical diets for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 4:209-215.
- Davis, D.A. and C.R. Arnold.** 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 114:285-292.
- Davis, D.A., A.L. Lawrence and D.M. Gatlin III.** 1993. Dietary zinc requirement of *Penaeus vannamei* and the effects of phytic acid on zinc and phosphorus bioavailability. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:40-47.

- Folke, C. and N. Kautsky.** 1991. Ecological economic principles for aquaculture development. pp. 207-222. In C.B. Cowey and C.Y. Cho (eds.). *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, pp. 1990. 275
- Hughes, K. Powers and J.H. Soares Jr.** 1998. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. *Aquaculture Nutrition* 4:133-140.
- Jackson, L.S., M.H. Li and E. H. Robinson.** 1996. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. *Journal of the World Aquaculture Society* 27:309-313.
- Ketola, H.G.** 1994. Use of enzymes in diets of trout to reduce environmental discharge of phosphorus. *World Aquaculture Society, Book of Abstracts*, 211 pp., World Aquaculture >94.
- Ma, T.S. and G. Zuazago.** 1942. Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Industrial and Engineering Chemistry* 14: 280-282.
- Maugle, P.D., O. Deshimaru, T. Katayama, T. Nagatani and K. Simpson.** 1983a. Effect of microencapsulated amylase and bovine trypsin dietary supplements on growth and metabolism of shrimp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 49:1421-1427.
- Maugle, P.D., O. Deshimaru, T. Katayama and K. Simpson.** 1983b. The use of amylase supplements in shrimp diets. *Journal of the World Mariculture Society* 14:25-37.
- McGinnis, A.J. and R. Kasting.** 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide used to study food utilization by phytophagous insects. *Agric. Food Chem.* 12: 259-262.
- Rijn, J.V. and M. Shilo.** 1989. Environmental factors in fish culture systems. pp. 163-178. In M. Shilo and S. Sarig (eds.). *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Spotte, S.** 1979. *Fish and invertebrate culture: water management in closed systems*, 2nd ed. Wiley, New York, New York, USA.
- Steel, R. G.D. and J.H. Torrie.** 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrics approach*. McGraw-Hill, New York, New York, USA.
- Storebakken, T., K.D. Shearer and A.J. Roem.** 1996. Availability of phosphorus, zinc and other elements to Atlantic salmon fed fish meal, soy protein concentrate or phytase treated soy protein concentrate based diets. *Proceedings of the VII International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish*.
- Tacon, A. G. J.** 1997. Global trends in aquaculture and aquafeed production 1984-1995. *International Aquafeed Directory and Buyers= Guide 1997/98*. Turret TAI PLC, publisher. p 5-38.
- Wenk, C.** 1992. Enzymes in the nutrition of monogastric farm animals. pages 205-218. In *Biotechnology in the feed industry*. Proceedings of Alltech's eighth annual symposium. Alltech Technical Publications. Nicholasville, Kentucky. USA.
- Wong, M.H., L.Y. Tang, and F.S.L. Kwok.** 1996. The use of enzyme-digested soybean residue for feeding common carp. *Biomedical and Environmental Sciences* 9: 418-423.