

TÉCNICA DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* EN INGREDIENTES Y ALIMENTOS PARA CAMARÓN

MARTHA GUADALUPE NIETO LÓPEZ*, LUCÍA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ*, DENIS RICQUE MARIE*, MARINA EZQUERRA BRAUER*

Entre las técnicas químicas de evaluación nutricional oficiales existen algunas que se pueden aplicar independientemente de la especie, pero en otros casos es indispensable que los resultados sean validados con evaluaciones *in vivo*; ésta es la situación de las técnicas de digestibilidad, las cuales constituyen un parámetro de calidad muy importante. No hay evidencia de que la metodología oficial para determinar digestibilidad *in vitro* (AOAC 1990)¹ posea buena correlación con la digestibilidad en el camarón, por otro lado, existen publicaciones (Carrillo, 1994;² Lazo, 1994;³ Ezquerra, 1997b⁴) que han desarrollado metodologías *in vitro* con enzimas de los propios camarones, pero ninguna de éstas se ha oficializado por falta de correlación con los resultados *in vivo*, o porque sólo se pueden aplicar para ingredientes y no para alimentos. Por ello, en este trabajo se propuso evaluar la correlación de la digestibilidad *in vivo* en camarón vs. la digestibilidad *in vitro*, determinada con el método del AOAC, y la metodología desarrollada para camarón más eficiente reportada hasta el inicio de este trabajo (pH-stat), utilizando como sustrato 15 harinas de pescado de calidad variable, previamente evaluadas en salmónidos y en mink, así como otros ingredientes y alimentos balanceados terminados.

Material y métodos

Harinas de pescado experimentales

Se evaluaron 12 harinas de pescado (F815 arenque, 539 arenque, 163 arenque, F813 capelin,

2204 tobis, TAF-1 anguila de arena, 11858 desperdicios de arenque, 1986, 1431 mackerel, 2002, 3664 desperdicios de pescado blanco y A3481 menhaden) y un concentrado proteico (CPSP) que fueron elaborados bajo diferentes procesos de secado y tres harinas de anchoveta elaboradas con materias primas de diferente frescura (fresca, moderada y descompuesta).

Dietas experimentales

Para obtener una dieta que cumpliera con los requerimientos nutricionales para camarón, publicados por Akiyama *et al.*,⁵ ésta se formuló como la de referencia en el programa Mixit-2 con una harina comercial.

Con las harinas experimentales se elaboraron 16 dietas que contenían 30% de cada una de las harinas y 70% de la dieta de referencia. La digestibilidad aparente *in vivo* para dietas y harinas de pescado se determinó mediante el sistema propuesto por Cho *et al.*⁶

La composición química de las harinas de pescado y los alimentos se determinó de acuerdo a los siguientes métodos: Kjeldahl⁷ para proteína, Soxhlet⁸ para lípidos, AOAC 942.05¹ para ceniza y AOAC 962.09¹ para fibra. Las pérdidas de proteína (PP) y materia seca (PMS) en las dietas, después de una hora de inmersión en agua marina (28°C y 35 g L⁻¹), fueron determinadas por el método Aquacop⁹ (tres replicados por dieta). El contenido de proteína y cromo en los alimentos y heces se determinó empleando el

*Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
E-mail: mnieto@ccr.dsi.uanl.mx

método Kjeldhal, modificado por Nieto *et al.*¹⁰

Bioensayo de digestibilidad

El bioensayo contó con tres replicados en el tiempo para cada dieta, utilizando siete camarones *L. vannamei* por acuario. El peso promedio de los camarones utilizados para cada replicado fue de 0.25, 0.4 y 0.55g. El alimento se distribuyó en dos raciones diarias para sumar el 10% de la biomasa en el acuario. Una hora después de alimentar a los camarones se colectaron las excretas (dos veces al día). La colecta se llevó a cabo hasta completar 100mg de heces secas. Posteriormente, las heces se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar el exceso de sales y evitar la interferencia de éstas en los métodos de análisis. Las heces fueron congeladas diariamente a -12°C y liofilizadas para su posterior análisis.

La digestibilidad aparente de la proteína (DAPD) y de la materia seca (DAMSD) en la dieta se determinó con las fórmulas de Maynard y Loosli.¹¹ Los valores de digestibilidad proteica (DAPDcor) y de materia seca (DAMSDcor) en las dietas fueron corregidos por lixiviación. La digestibilidad aparente de la proteína (DAPI) y de la materia seca (DAMSI) de las harinas de pescado se determinó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{DAPI} = [100 * \% \text{DAPD} * \% \text{PDE} - (100 - \% \text{IP}) * \% \text{DAPDRef}] / (\% \text{IP} * \% \text{PI})$$

$$\text{DAMSI} = [100 * \text{DAMSD} - (100 - \% \text{IP}) * \% \text{DAMSDRef}] / \% \text{IP}$$

Donde DAPD = % de digestibilidad aparente de la proteína en la dieta, PDE = % de proteína en la dieta, IP = % de inclusión del ingrediente a evaluar (en base seca en la mezcla de ingredientes), DAPDRef = % de digestibilidad aparente de la proteína en la dieta de referencia, PI = % de proteína en el ingrediente a probar (en base seca); DAMSD = % de digestibilidad de la materia seca en la dieta, % DAMSDRef = % de digestibilidad aparente de la materia seca en la dieta de referencia.

Correlación entre la digestibilidad *in vivo* de las harinas de pescado y la digestibilidad en otras especies

Se determinó el coeficiente de correlación entre la

digestibilidad *in vivo* en camarón y la digestibilidad *in vivo* determinada en mink, salmón y trucha (datos obtenidos previamente), con la finalidad de determinar si estos resultados se podían utilizar para predecir la digestibilidad en el camarón. En los casos donde el coeficiente de correlación tuvo una probabilidad inferior a 0.05 se determinó la ecuación de predicción mediante un análisis de regresión lineal.

Determinación de digestibilidad *in vitro*

Medición de la tasa inicial de hidrólisis

Para la determinación del grado de hidrólisis por el método de pH-Stat se utilizó como enzima un homogeneizado del hepatopáncreas de *L. vannamei*. El extracto se realizó a partir de glándulas digestivas previamente liofilizadas, las cuales fueron en seguida trituradas en de buffer TRIS HCl 10mM pH 7.5 a 40°C (0.307g en 100 ml), con la ayuda de un ultratriturador. El triturado se centrifugó durante 30 min a 10,000g a -20°C. Los lípidos sobrenadantes fueron separados y eliminados con la ayuda de una espátula. Se determinó la actividad proteolítica total y específica (Kunitz, 1946, modificado por Clark *et al.*),¹¹ la actividad trípica (Erlanger *et al.*)¹² y la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (1976).¹³

El grado de hidrólisis se determinó por triplicado, tanto para las harinas como para las dietas; las muestras fueron molidas a 35 mallas y homogeneizadas en agua destilada con un ultratriturador (8mg de proteína/ml) y 10 ml de la suspensión se colocaron dentro del recipiente de hidrólisis; el pH fue ajustado a ocho con NaOH al 0.1M. La reacción se inició con la adición de 2 ml del homogeneizado enzimático (con una actividad proteolítica de 6.21 u/mg de proteína). El pH se mantuvo en ocho y se midió la cantidad de NaOH 0.1N utilizado para mantener dicho pH durante 30 min a 25°C.

El grado de hidrólisis de la proteína se determinó con la siguiente fórmula (Dimes and Haard):¹⁴

$$\text{DH}\% = [(B * \text{Nb} * 1.5 / M * (S\% / 100)) / 8] * 100$$

Donde: B = ml de NaOH 0.1N utilizados para mantener el pH en 8, Nb = Normalidad del NaOH, 1.5 factor de calibración a pH de 8 y 25°C, M = gramos de la mezcla, S = concentración de proteína en la mezcla (%) y 8 es el contenido total de

enlaces peptídicos (meq/g) para la proteína de trigo o caseína (Adler- Nissen, 1986).

Como una modificación adicional, el grado de autohidrólisis de las muestras se determinó mediante la incubación de éstas en las mismas condiciones de prueba, sin la adición del homogeneizado enzimático. Esto nos permitió estimar el grado de hidrólisis corregidos por la adición del extracto:

$$DH\% \text{ corr.} = \left[\frac{(B-B') \cdot N_b \cdot 1.5 / M \cdot (S\% / 100)}{8} \right] \cdot 100$$

Donde B' son los ml de NaOH 0.1N utilizados para mantener el pH en 8.0 durante 30 min 25°C.

Método de digestibilidad *in vitro* con pepsina diluida (A.O.A.C., Torry modificado)

La digestibilidad con pepsina de las muestras se determinó por el método de Torry, empleando una solución de pepsina al 0.0002% (Sigma P-7000, actividad 1:10 0000), como lo describen Olley y Pirie¹⁵ y Olsen,¹⁶ con pequeñas modificaciones, ya que las muestras fueron molidas a 35 mallas, se utilizó papel filtro Watman #1, y el método Kjeldahl se llevó a cabo en un sistema kjeltec Tecator.

La digestibilidad con pepsina se calculó para dietas y harinas con la fórmula A, y adicionalmente para las harinas se calculó la digestibilidad sin corregir por la solubilidad del nitrógeno en ácido con la fórmula B:

A: % DPep corr = [(NRI en ácido – NRI en solución con pepsina) / NRI en ácido] * 100

B: % DPep = [(N total – NRI en solución con pepsina) / N total] * 100

Donde: DPep corr = Digestibilidad con pepsina corregida por la solubilidad de la proteína en ácido, DPep = Digestibilidad con pepsina sin corregir, NRI = Nitrógeno residual insoluble.

Método de digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (tipo A.O.A.C., Torry modificado)

La digestibilidad se determinó empleando dos replicados. Las muestras se molieron a 35 malla y se utilizaron para todas las muestras: 6.25mg de proteína/ml homogeneizadas en 50 ml de buffer tris 50mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8, se mezclaron con 0.84 ml de extracto enzimático crudo (actividad proteolítica de 1.48 U/mg de proteína).

Las muestras se incubaron con agitación constante a 30°C, por seis y 24 horas para las harinas

de pescado, y seis horas para las dietas. Al final del período de incubación se filtraron en un papel Watman #2 y la proteína residual se determinó con el método Kjeldhal en un sistema kjeltec Tecator.

La digestibilidad de la proteína se calculó mediante la fórmula del método oficial (AOAC, 1990), tomando el total de proteína presente (fórmula A) o corrigiendo mediante la utilización de un tercer replicado en el que no se adicionó enzima (fórmula B).

Una vez estandarizada esta técnica, se utilizó en determinar si podía ser empleada para distinguir entre la digestibilidad de diferentes ingredientes, y para otras especies de camarón. Se evaluó la digestibilidad *in vivo* en *L. vannamei* y en *L. stilyrostris* de diferentes fuentes proteicas, así como de dietas preparadas con éstas, utilizando como ingredientes: gluten de trigo, harina de trigo, pasta de soya, harina de pluma, harina de camarón, harina de calamar y dos diferentes harinas de pescado llamadas A y B.

La digestibilidad proteica *in vitro*, para las harinas y dietas, se determinó a 24 horas de hidrólisis, empleando dos replicados por cada muestra y 0.8375 ml de homogeneizado de *L. vannamei* en 50 ml de sustrato (1484.1 u) o 0.8499 ml en 50 ml de sustrato de un homogeneizado de *L. stilyrostris* (1462.5 u).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos, en los diferentes métodos de determinación de digestibilidad proteica *in vitro* para las dietas y harinas, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una sola vía, seguido por una comparación múltiple de medias por el método de Duncan a una probabilidad de 0.05 (SPSS software), para determinar si existían diferencias entre ellos.

Los resultados del estudio de digestibilidad proteica *in vivo* en camarón fueron correlacionados con los valores *in vitro* y analizados estadísticamente para determinar sus coeficientes de correlación. En los casos donde el coeficiente de correlación presentó una probabilidad inferior a 0.05 se llevó a cabo la determinación de la ecuación de predicción mediante un análisis de regresión lineal.

Resultados

Análisis proximal de las harinas de pescado

El contenido de proteína y ceniza presentó un ran-

go de 63.6 a 74.8% y 10.2 a 19.63%, respectivamente, encontrándose una correlación negativa significativa ($r=-0.90$) entre el contenido de proteína y de ceniza de las harinas de pescado (HP) experimentales. Para fines de análisis e interpretación de resultados, se definieron tres grupos de HP, considerando su contenido de proteína y ceniza en base húmeda:

Grupo I. Seis HP con un alto contenido de proteína $>72\%$ y un muy bajo contenido de ceniza $<12\%$ (F815 arenque, 539 arenque, 163 arenque, F813 capelin, 2204 tobis, TAF-1 anguila de arena) y CPSP.

Grupo II. Siete HP con 70-65% de proteína y 12-15% de ceniza (11858 desperdicios de arenque, 1986 fresca anchoveta, 1431 mackerel, 2002, moderada anchoveta y descompuesta anchoveta).

Grupo III. Dos HP pobres en proteína $<64.5\%$, y ricas en ceniza $>18\%$ (3664 desperdicios de pescado blanco y A3481 menhaden).

La humedad fue de 5.6 a 11.0%. El contenido de lípidos varió entre 6.6 y 11.6; HP A3481 menhaden, 1431 mackerel y 11858 desperdicios de arenque fueron particularmente ricas en lípidos ($>10\%$).

El contenido de proteína soluble en ácido en la harina de pescado, determinado bajo condiciones de ácido débil (150 ml de HCl 0.075 N para 1g de harina, ver apéndice 1), fue muy variable, tres grandes grupos de harinas de pescado pueden ser visualizados: uno con un contenido de proteína soluble de 17 a 22.4% ($n=7$ HP), con las harinas noruegas de arenque 539/93 y 163/94 presentando los valores más bajos de proteína soluble (17 y 18.3%, respectivamente), lo que refleja que estas dos harinas fueron hechas principalmente de torta de prensa, sin solubles concentrados adicionados. Un segundo grupo con proteína soluble de 24.2 a 29% ($n=7$) y un tercer grupo con sólo una HP (F813) con 42%. El CPSP, como se esperaba, tiene más de la mitad de la proteína soluble en ácido (63.77%), ya que fue previamente hidrolizada.

Análisis proximal y lixiviación de las dietas

Los contenidos de proteína, ceniza y lípidos de las dietas se relacionan muy bien con la composición de las harinas examinadas. El contenido de proteína va de 39.7 a 44.9, con excepción de la dieta de referencia que obtuvo un valor de 30.4%, debido a la ausencia de harina de pescado experimental en

ésta. El contenido de ceniza va de 13.10 a 15.65% y el contenido de lípidos presentó un rango de 7.37 a 13.37%.

La lixiviación de las dietas fue significativamente diferente y muestra un rango que va de 13.4 a 29%. La pérdida más alta de materia seca (29%) fue observada para la dieta basal, probablemente debido a su alto contenido de pasta de soya, cuyas propiedades mecánicas desfavorecen la estabilidad del *pellet*. Debido a que esta dieta es utilizada en un 70% de inclusión en las dietas experimentales, era de esperarse que su lixiviación fuera también alta; sin embargo, la inclusión de las harinas de pescado mejoró la estabilidad. Existe una correlación significativa entre lixiviación y el contenido de proteína soluble de las HP ($r=0.60$). Las tasas de lixiviación de las otras dietas experimentales se encontraron entre 13.4 y 18.5%.

Determinación de la digestibilidad *in vivo* en camarón

El bioensayo *in vivo* permitió diferenciar la digestibilidad de las HP, ya que los ANOVA mostraron diferencias significativas (tabla I, $P < 0.0001$).

El rango de digestibilidad de la materia seca de las dietas (DAMSD 84.5-75.7%) fue más pequeño que para las harinas (DAMSHP 84.9-56.0%). La digestibilidad de la proteína también presentó un rango más corto para las dietas (DAPD 94.0-84.1=9.9%) que para las HP (DAPHP 98.7-75.8=22.9%), debido probablemente a que las diferencias de calidad de las harinas se ven disminuidas al ser agregadas a un alimento terminado, y esto es ocasionado por los efectos asociativos entre los ingrediente (Brown *et al.*).¹⁷

En general, la digestibilidad proteica de la dieta o HP fue más alta que la digestibilidad de la materia seca, probando que los otros nutrientes eran menos digestibles que la proteína (Akiyama, *et al.*).¹⁸

La digestibilidad proteica y de la materia seca fue generalmente más baja para los ingredientes (HP) que para las dietas, salvo para el CPSP y la harina F813, las cuales tuvieron la digestibilidad más alta de materia seca o proteína, y las dietas correspondientes tenían las más altas digestibilidades. La digestibilidad de la materia seca de estas dos dietas fue igualada sólo por la dieta base (84.36%), y las tres tuvieron la más alta lixiviación. Por lo tanto, aparentemente la digestibilidad fue sobreestimada por los nutrientes solubles lixiviados

antes de la digestión.

La frescura de la materia prima afecta ligeramente su digestibilidad, esto puede ser atribuido a su alto grado de hidrólisis (lo cual es también cierto para el CPSP), pero también a una alta tasa de lixiviación, debido a una alta solubilidad de la proteína hidrolizada. Por ello, la digestibilidad no debe ser el único criterio de calidad a considerar en el momento de seleccionar una harina de pescado para dietas de camarón.

Tabla I. Digestibilidad en camarón de las dietas e ingredientes de prueba.

PC (%)	No. Idnent dietas	Dietas		Ingredientes	
		DAMSD (%)	DAPD (%)	DAMSHP (%)	DAPHP (%)
74.8	12 (F815)	83.61±0.9 _{af}	91.81±0.63 _{ig}	81.83±2.95 _{de}	91.02±1.2 _{fg}
74.2	6 (539/93)	83.43±0.3 _{af}	91.42±0.36 _{afg}	81.28±0.9 _{de}	88.22±0.68 _{af}
74	1(163/94)	75.68±1.2 _a	84.13±0.84 _a	56.03±3.78 _a	75.84±1.63 _a
73.5	2(CPSP)	84.53±1.1 _f	94±0.44 _h	84.93±3.47 _c	98.74±.88 _h
73	10(F813)	84.33±1.7 _f	92.94±1.05 _{gh}	84.27±5.64 _c	95.98±2.07 _h
72.1	7(2204)	80.01±0.7 _c	86.99±0.99 _b	69.8±2.37 _b	79.82±1.93 _b
72.1	11 (TAF)	83.5±0.4 _d	90.7±0.74 _{def}	81.47±1.31 _{de}	87.47±1.43 _{def}
70.4	5 (11858)	80.73±1.2 _{cd}	90.32±0.38 _{def}	72.07±4.13 _{bc}	86.46±0.75 _{def}
70.1	8 (1986)	80.34±0.6 _c	87.24±0.81 _b	71.05±1.88 _b	81.21±1.6 _b
69.6	15 (Fresca)	82.03±1.2 _{cde}	89.02±1.69 _{cd}	76.53±4.17 _{bcd}	85.55±3.37 _{cde}
69.2	13 (1431)	82.65±1.3 _{def}	90.96±1.2 _{def}	78.64±4.4 _{cde}	92.2±2.43 _g
68.4	4 (2002)	80.3±1.9 _c	87.56±1.79 _{bc}	70.92±6.42 _b	82.61±3.6 _{bc}
67.7	16 (Mod.)	80.77±2.1 _{cd}	88.95±1.77 _{cd}	72.16±7.02 _{bc}	86.49±3.6 _{cde}
65.8	14 (Desc.)	81.72±0.9 _{cde}	90.52±1.29 _{def}	75.37±3.01 _{bcd}	88.96±2.65 _{efg}
64.2	3 (3664)	77.86±1.1 _b	89.49±0.97 _{de}	62.3±3.67 _a	83.71±1.99 _{bcd}
63.6	9 (A3481)	82.92±0.3 _{af}	89.97±0.84 _{def}	79.51±1.08 _{de}	85.27±1.73 _{cde}
	17 Tepual	84.36±0.3 _f	91.61±0.29 _{ig}		
	Máx	84.5	94	84.9	98.7
	Min	75.7	84.1	56	75.8
	Rango	8.8	9.9	28.9	22.9
	Prob. ANOVA	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001

Para todos los parámetros evaluados, la harina de pescado 163/94 siempre presentó los valores más bajos (lo cual también puede ser observado en los tratamientos D y E con salmónidos). La gran diferencia entre esta harina y todas las otras radica probablemente en el excesivo proceso de secado, lo cual sugiere que el camarón es muy sensible al deterioro térmico de las proteínas de pescado (Pike).¹⁹

Correlación con digestibilidad en otras especies

La correlación entre la digestibilidad proteica *in vivo* en camarón y la de las diferentes especies de salmónidos (tabla II) fue apenas significativa para los tratamientos B, C, D y E (P de 0.02 a 0.11), y no

Tabla II. Coeficiente de correlación (r y r²) entre la digestibilidad proteica de las harinas (DAPHP) en camarón con mink (n=15), trucha y salmón (n=13)

	r	Camarón r ²	p
Mink	0.2075	0.0430	0.4579
Trucha A	-0.0247	0.0006	0.9361
Trucha B	0.5079	0.2579	0.0763
Salmón C	0.5740	0.3295	0.0402
Salmón D	0.6211	0.3857	0.0234
Salmón E	0.4664	0.2175	0.1081

significativa para el tratamiento A, mientras el coeficiente de correlación con mink fue sólo de r²=0.04, con una p=0.46.

Estos resultados fueron examinados después de aplicar dos correcciones: excluyendo las harinas que presentaban bajo contenido de proteína y alto de ceniza, y calculando la digestibilidad corregida por lixiviación, se observó que es posible calcular la digestibilidad de la materia seca de una HP para camarón, una vez que se determinó la digestibilidad de la proteína en salmón, siempre y cuando la harina contenga más de 65% proteína y menos de 15% ceniza, con las siguientes ecuaciones de la regresión:

$$\% \text{ DAPHP en salmón} = 0.33 * \% \text{ DAMSHP en camarón} + 61$$

$$\% \text{ DAPHP en salmón} = 0.29 * \% \text{ DAMSHP lixcor en camarón} + 63.$$

Determinación del grado de hidrólisis (DH) utilizando pH-Stat para camarón

Los resultados del DH de las HP y dietas fueron significativamente diferentes (P=0.00001) y presentaron un rango de 21.61 a 39.6 y 13.20 a 29.51, respectivamente.

Los valores de autohidrólisis de las harinas de pescado fueron de 4.55 a 1.42% y fue muy bajo en el caso del CPSP (0.06%). Estos valores presentaron una correlación con el contenido de ceniza de las HP (r=0.58), con el contenido de proteína de la HP (-0.51) y con la proteína soluble en ácido (-0.50), debido probablemente a que las harinas de pescado con poca proteína y alta ceniza sean elaboradas a partir de subproductos de pescado, y poseen mayor concentración de enzimas; por otro lado, la proteína insoluble puede ser hidrolizada y causar cambio en el pH.

El DH corr., en las HP y dietas, presentó un amplio rango (13.6 a 35.4 y de 10.2 a 29.4%).

La correlación de la digestibilidad en camarón (DAPHP) fue mejor con la Dhcorr que con la no corregida ($r = 0.51$ vs $r = 0.38$, respectivamente, $n=16$), pero esta correlación mostró una mejoría cuando las 2 HP con alto contenido de ceniza y bajo de proteína (3664 y A3481) fueron omitidas, obteniendo una alta significancia ($r=0.80$, $P=0.0006$, $n=14$)(figura 1a), con la siguiente regresión:

$$\% \text{ DAPHP en el camarón} = \% \text{ DHcorrHP} * 1.2965 + 0.919.$$

La correlación entre la digestibilidad de la HP *in vivo* y el DHcorrHP se determinó, posteriormente ($r=0.88$, $p = 0.0097$), utilizando sólo las HP con más de 72% de proteína y menos del 12% de ceniza (figura 1b).

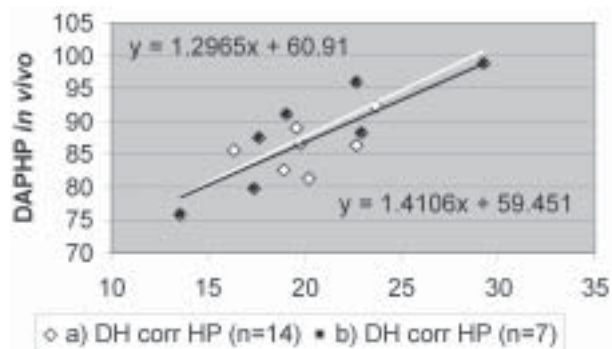


Fig. 1. Regresión lineal entre la digestibilidad *in vivo* (DAPHP) y DhcorrHP; a) sin harinas altas en ceniza/baja proteína; b) sin harinas con proteína <70%.

El DH no fue bueno para predecir la digestibilidad de las dietas para camarón, ya que no se correlacionó significativamente con los valores de la digestibilidad *in vivo* de la dieta.

Determinación de la digestibilidad con pepsina (A.O.A.C., Torry modificado)

La Dpep corr da valores muy bajos (de 91.7 a 25.5), y no se obtiene una buena correlación con la digestibilidad *in vivo*; sin embargo, al utilizar los valores sin corregir (Dpep va de 91.14 a 62.67 para las dietas y de 98.91 a 42.69 para las harinas), se encontró que la correlación con el estudio *in vivo* era mucho mejor ($r^2= 0.67$, $p= 0.00008$, $n= 16$) (fi-

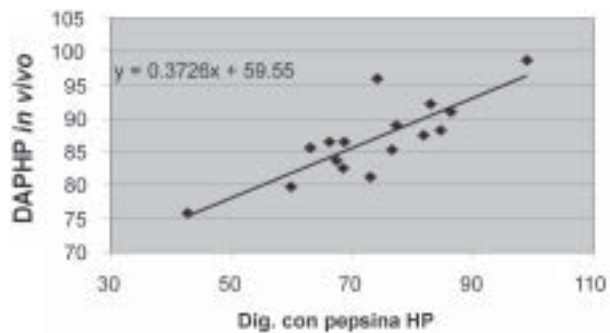


Fig. 2. Regresión lineal entre la digestibilidad *in vitro* con pepsina diluida (sin corrección por proteína soluble) y la digestibilidad *in vivo* (DAPHP).

gura 2). Esto puede ser explicado porque, en ambos casos, la proteína soluble da una sobreestimación de la digestión, sobre todo para las HP con un alto contenido de proteína soluble.

La correlación entre la digestibilidad con pepsina y la DAPHP no se modificó al excluir las HP con baja proteína/alta ceniza de la base de datos.

Determinación de la digestibilidad in vitro con enzimas de camarón (Tipo A.O.A.C.)

La digestibilidad proteica *in vitro*, determinada a seis horas de hidrólisis para las dietas (DPD-6h) y para las harinas de pescado (FMPD-6h), muestra un rango que va de 36.8 a 64.16 y de 24.16 a 92.25, respectivamente; para las HP a 24 horas (FMPD-24h), el rango de digestibilidad va de 42.7 a 94.4. Cuando se considera el contenido de proteína soluble de las harinas de pescado, la digestibilidad corregida (FMPDc-24h) va de 9.5 a 65.71. En to-

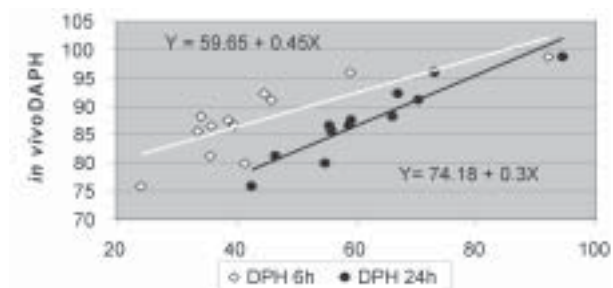


Fig. 3. Correlación entre la digestibilidad *in vitro* de las harinas a seis y 24 horas de hidrólisis y la digestibilidad *in vivo*, eliminando las harinas con más de 14.5% de ceniza.

dos los casos se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) entre las digestibilidades proteicas de las dietas *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.77$, $r^2 = 0.6$, $p = 0.0005$, $n = 16$), así como entre las digestibilidades proteicas de la harina a seis y 24 horas de hidrólisis ($r = 0.74$, $r^2 = 0.54$, $p = 0.001$, $n = 16$ y $r = 0.89$, $r^2 = 0.8$, $p = 0.000003$, $n = 16$, respectivamente), mejorando para las harinas cuando no se consideran las harinas de pescado de más de 14.5% de ceniza (figura 3) ($r = 0.8$, $r^2 = 0.64$, $p = 0.0017$, $n = 12$ y $r = 0.93$, $r^2 = 0.86$, $p = 0.00001$, $n = 12$, respectivamente).

Determinación de digestibilidad *in vitro* en otros ingredientes

La digestibilidad proteica *in vitro* para los ingredientes (DPI-24h) y las dietas (DPD-24h) con un homogeneizado de *L. vannamei* mostró un rango que va de 19.99 a 85.09 y de 34.51 a 48.98, respectivamente; con el homogeneizado enzimático de *L. stylirostris* el rango de digestibilidad fue de 9.52 a 80.61 y de 31.31 a 47.91.

Al utilizar el homogeneizado enzimático de *L. stylirostris* se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) entre la digestibilidad proteica de las dietas *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.76$, $r^2 = 0.57$, $p = 0.03$, $n = 8$), pero no entre la digestibilidad proteica de los ingredientes *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.46$, $r^2 = 0.21$, $p = 0.25$, $n = 8$). Sin embargo, al eliminar la harina de trigo, la correlación se mejora significativamente ($r = 0.87$, $r^2 = 0.75$, $p = 0.012$, $n = 7$).

Las correlaciones entre la digestibilidad proteica *in vivo* e *in vitro*, para dietas y harinas con el homogeneizado enzimático de *L. vannamei*, no fueron significativas. Esto puede ser debido a que los valores encontrados para la digestibilidad *in vivo* no corresponden a lo encontrado en literatura (Akiyama).¹⁸

Conclusión

La DAPHP en camarón es afectada fuertemente por la exposición a la temperatura en los secadores, pero no por la frescura de la materia prima, y se incrementa significativamente con el contenido de proteína soluble.

La DAPHP en camarón tiene una correlación muy baja con la DAPHP en salmón, menor con trucha y ninguna con mink.

La digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón utilizando el pH-Stat se correlaciona, significativamente, con DAPHP en camarón para las harinas de pescado con contenidos de proteína superiores a 65% y contenido de ceniza más bajo que 15%.

La digestibilidad con pepsina diluida (AOAC, Torry modificada), sin corregir los valores por la solubilidad de la proteína en solución ácida, dio inesperadamente una mejor correlación con la DAPHP en camarón que el método de pH-Stat. Esta correlación altamente significativa no fue afectada por la presencia de un contenido de ceniza superior a 15%, o un contenido de proteína menor de 65%.

El método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (tipo A.O.A.C.) fue efectivo para evaluar el resultado del procesamiento sobre la digestibilidad proteica de un ingrediente en particular (harina de pescado) o de una formulación (dietas) para camarón. Este método funciona mejor cuando las harinas de pescado tienen un contenido de ceniza menor a 14.5%.

El método de determinación de la digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón (tipo AOAC) puede ser utilizado para determinar la digestibilidad proteica de ingredientes de origen animal y de dietas comerciales.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó si algunas técnicas *in vitro* o la digestibilidad en otras especies podrían ser aplicadas en el control de calidad de harinas de pescado, dietas y otros ingredientes utilizados en la alimentación del camarón *Litopenaeus vannamei*. Para ello se determinaron los coeficientes de correlación obtenidos en la digestibilidad *in vivo* en camarón y la digestibilidad *in vivo* en otras especies (salmón, trucha o mink), o con cada una de las diferentes técnicas *in vitro*. En conclusión, la digestibilidad proteica obtenida en salmónidos, trucha o mink no puede ser un buen indicador para la nutrición del camarón, debe ser reemplazada por los métodos de digestibilidad *in vitro*: a) con pepsina diluida (AOAC, Torry modificado) para harinas de pescado, pero no para dietas, b) utilizando extractos crudos de hepatopáncreas: pH-Stat, para harinas con alta proteína/ baja ceniza, o determinación de la digestibilidad *in vitro*, con enzimas de camarón (tipo AOAC, no corregido) para harina de pescado, dietas u otros ingredientes de origen animal.

Palabras clave: Calidad proteica, Digestibilidad, Camarón, Harina de pescado.

Abstract

In the present study, was evaluated if some *in vitro* techniques or the digestibility in other species could be used for the quality control of fish meal, diets and other ingredients used in the feeding of the *Litopenaeus vannamei* shrimp. For this were determined the correlation coefficients obtained between the *in vivo* digestibility in shrimp and the *in vivo* digestibility in other species (salmon, trout or mink) or with each one of the several *in vitro* techniques. In conclusion, the protein digestibility obtained for salmonids, trout or mink cannot be used as a indicator for shrimp nutrition, and should be replaced by *in vitro* digestibility methods a) by using dilute pepsin (AOAC, Torry modified) for a large range of fish meals but not for diets b) by using an hepatopancreas crude extract: shrimp pH-Stat for high protein/low ash fish meals, or determination of the *in vitro* digestibility with shrimp enzymes (AOAC, Type, corrected) for fish meals, diets or other animal ingredient.

Keywords: Protein quality, Digestibility, Shrimp, Fish meals.

Referencias

1. A.O.A.C. 1990. Official Methods Analysis. 12th. Ed. Association of Official Analytical Chemist. Elliam Horritz Ed. Washington, D C.
2. Carrillo O. F., (1994). "Producto multienzimático del hepatopáncreas de camarón: reactivo y suplemento dietético". Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, del 7 al 9 de noviembre.
3. Lazo, J. P. (1994) «Evaluation of several *in vitro* enzyme assays for estimating *in vivo* apparent protein digestibility by the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*.» Thesis Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical Collage pp. 62.
4. Ezquerro M., F. García Carreño, R. Civera, and N. Haard. (1997a). "pH-stat method to predict digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 157:249-260.
5. Akiyama, D., W. Dominy and A. L. Lawrence (1991) «Penaeid Shrimp Nutrition for the Commercial Feed Industry: REVISED*» Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop» American Soybean Association. 80 - 98.
6. Cho C.Y., y Slinger, S., 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. Finfish nutrition and Feedfish Technology. Vol. II. 239-247LP.
7. Tecator, 1987. Determination of Kjeldahl Nitrogen Content with Kjeltex System 1026. Application note AN 86/87 (1987.02.18). Kjeltex 1026 Manual, Tecator AB, Sweden.
8. 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.
9. Aquacop, 1978. Study on nutritional requirements and growth of *Penaeus merguensis* in tanks by means of purified and artificial diets. Proc. World Maricult. Soc. Annu. Meet., 9, 225-234.
10. Nieto López, M.G., Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque. (1997). Implementación de un método para la determinación de óxido de cromo y proteína en micromuestras de alimento y heces de camarón. Oral paper presented at the International Conference: "VI Reunión de Nutrición Animal", UANL, Fac. de Agronomía, Monterrey, N.L., México. Octubre 22-24, 5 pages paper in the proceedings. p. 211-214.
11. Maynard L.A., Loosli J.K., Hintz H.F. and Warner. R.G. (1981). Nutrición Animal. Cuarta edición. Mc Graw Hill. U.S.A. 640 pp.
12. Clark J., K.R. Murray, and J.R. Stark. (1986). "Protease development in dover sole [*Solea solea* (L)]". Aquaculture, 53:253-262.
13. Erlanger B.F., N. Kokowsky and W.Cohen (1961). "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin". Archives of Biochemistry and Biophysics 95, 271-278.
14. Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem., 72:248 -254.
15. Dimes L. and N. Haard (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.
16. Olley, J. and Pirie R. 1966. The pepsin digestibility method at low pepsin strengths. Int. Fich. News,

- 5:27-29.
17. Olsen (1969) «Pepsin Digestibility Test (Torry Modificado).» Memorias Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Vol II, Compilado de técnicas de análisis. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 16-17 noviembre.
 18. Brown P., E. Robinson, A. Clark and A.L. Lawrence. (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.
 19. Akiyama, D., W. Dominy and A.L. Lawrence (1993) “Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales” Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
 20. Pike I. H. (1994). «Marine products for aquaculture the future.» Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León del 7 al 9 de noviembre.