



Programa de Estudios de Posgrado

**“Valor nutricional del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp) para  
camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).”**

## **TESIS**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

En el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Acuicultura)

Presenta

**Martha Elisa Rivas Vega**

La Paz, B. C. S., México

Mayo de 2006

### ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 20 del Mes de Abril del 2006, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**" Valor nutricional del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.) para camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) "**

Presentada por el alumno:

**Martha Elisa Rivas Vega**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

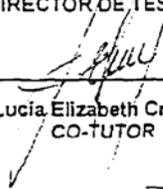
#### LA COMISION REVISORA



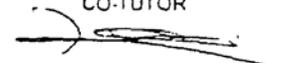
Dr. Roberto Civera Cerecedo  
DIRECTOR DE TESIS



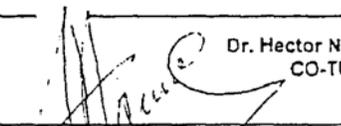
Dra. Josafat Marina Esquerza Brauer  
CO-TUTOR



Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez  
CO-TUTOR



Dr. Hector Nolasco Soria  
CO-TUTOR



Dr. Alfredo Hernández Llamas  
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## Conformación de comités

### Comité tutorial

Dr. Roberto Civera Cerecedo	Director de tesis
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez	Co-tutor
Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer	Co-tutor
Dr. Héctor Nolasco Soria	Co-tutor
Dr. Alfredo Hernández Llamas	Co-tutor

### Comité revisor de tesis

Dr. Roberto Civera Cerecedo	CIBNOR
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez	UANL
Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer	UNISON
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Alfredo Hernández Llamas	CIBNOR

### Jurado de examen de grado

Dr. Roberto Civera Cerecedo	CIBNOR
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez	UANL
Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer	UNISON
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Alfredo Hernández Llamas	CIBNOR
Suplente: Dra. Lucía Ocampo Victoria	CIBNOR

## Resumen

La evaluación nutricional de ingredientes vegetales para su uso en la elaboración de alimentos para camarones es necesaria, desde el punto de vista ecológico y económico para el desarrollo sustentable de la acuicultura. En este trabajo se evaluó la calidad nutricional del frijol yorimón *Vigna unguiculata* en alimentos para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Se elaboraron 5 harinas experimentales de frijol yorimón: entero, decortinado, cocido, germinado y extruido. Estas harinas fueron caracterizadas químicamente para conocer el aporte de nutrientes y contenido de factores antinutricionales. Se les determinó la composición química proximal; así como el contenido de calcio, fósforo, ácidos grasos, inhibidor de tripsina, ácido fítico, su perfil de aminoácidos y sus características térmicas. La harina de frijol yorimón entero presentó 26.1 % (p/p) de proteína cruda, 66.3 % (p/p) de carbohidratos, 0.12 % (p/p) de calcio, 0.55 % (p/p) de fósforo; el contenido de proteína aumentó por la germinación hasta 29.5 % (p/p). Los principales factores antinutricionales normalmente encontrados en las leguminosas son el inhibidor de tripsina y el ácido fítico. A pesar de esto, la harina de frijol yorimón entero presentó únicamente 7.52 Unidades de Inhibidor de Tripsina (UIT)/mg de muestra seca, la actividad del inhibidor de tripsina disminuyó significativamente por efecto de la cocción, y no se detectó después del proceso de extrusión. El ácido fítico se encontró en 0.53 % (p/p) en la harina de frijol yorimón entero y disminuyó hasta 34 % (0.35 g/100 g de muestra seca) en la harina de frijol yorimón germinado. La entalpía de transición de las harinas disminuyó de 6.16 J/g en la harina de frijol entero, hasta desaparecer en la harina de frijol yorimón extruido. La digestibilidad *in vivo* de proteína, carbohidratos, lípidos, fósforo y la

digestibilidad expresada en términos de energía del frijol yorimón entero en *Litopenaus vannamei* fue de 86.3, 71.0, 77.2, 57.1 y 76.6 %, respectivamente; y aumentó significativamente por efecto de la cocción, germinación y extrusión. Asimismo, se evaluó el efecto del nivel de inclusión de la harina de frijol yorimón entero en alimentos para *L. vannamei*, sobre el crecimiento y balance energético, incluyéndose en los alimentos al 0, 15, 30, 45 y 60 % (p/p), sustituyendo a una mezcla de pasta de soya y harina de trigo (1:2). Se encontró que la inclusión de la harina de frijol yorimón entero no afectó de manera significativa ( $p>0.05$ ) el crecimiento, la supervivencia o el alimento consumido, pero sí afectó de manera negativa ( $p<0.05$ ) el factor de conversión alimenticia y la eficiencia proteica cuando fue incluido al 60 % (p/p). El balance energético mostró que la energía es más eficientemente utilizada con un nivel de inclusión de hasta 30 % (p/p). Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se considera que el frijol yorimón es una fuente de proteína y carbohidratos, que contiene bajos niveles de factores antinutricionales, y que puede ser incluida en el alimento de juveniles de *Litopenaeus vannamei* hasta en 30 % (p/p) sin afectar el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento.

Palabras clave: Frijol yorimón, *Vigna unguiculata*, camarón, *Litopenaeus vannamei*, digestibilidad, crecimiento.

## Abstract

From an ecological and economic point of view, the nutritional evaluation of vegetable ingredients for the preparation of shrimp feed is necessary for the sustainable development of aquaculture. In this work, the nutritional value of cowpea *Vigna unguiculata* as ingredient in diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was evaluated. Five experimental cowpea meals were prepared: whole, dehulled, cooked, germinated, and extruded. These meals were characterized chemically for nutritional value and anti-nutritional factors. Proximate composition and content of calcium, phosphorus, fatty acids, trypsin inhibitor, phytic acid, amino acid profile and thermal characteristics were determined. Whole cowpea meal contained 26.1 % (w/w) crude protein, 66.3 % (w/w) carbohydrates, 0.12 % (w/w) calcium, 0.55 % (w/w) phosphorus; germination increased the protein content to 29.5 % (w/w). The main anti-nutritional factors found in legumes are trypsin inhibitors and phytic acid, in spite of this, whole cowpea meal only presented 7.52 Trypsin Inhibition Units (TIU)/mg dry sample. Trypsin inhibitors diminished significantly by cooking and were not detected in cowpea extruded meal. Phytic acid was found in whole cowpea meal at 0.53 % (w/w), and decreased 34 % (0.35 g/100 g dry sample) in germinated cowpea meal. Transition enthalpy was below 6.16 J/g in whole cowpea meal, and was negligible small in cowpea extruded meal. The *in vivo* digestibility of protein, carbohydrates, lipids, phosphorus, and digestibility expressed as energy of whole cowpea meal for *Litopenaeus vannamei* were 86.3, 71.0, 77.2, 57.1, and 76.6 % respectively, and increased significantly by cooking, germination, and extrusion. Also, the effects on growth and energy balance of using whole cowpea meal at different inclusion levels (0, 15, 30, 45

y 60 % (w/w)) in diets for *L. vannamei* was evaluated by replacing soybean meal and wheat flour. The use of cowpea meal did not affect growth, survival, or feed intake, but at the 60 % (w/w) inclusion level, it did negatively affect the feed conversion ratio and the protein efficiency. The energy balance analysis showed that energy use is more efficient with inclusion levels of whole cowpea meal up to 30% (w/w). On the basis of the results obtained in the present work, we consider cowpea to be a source of protein and carbohydrates, containing low levels of anti-nutritional factors, and that it can be included in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets up to 30 % (w/w) without affecting growth and feed efficiency.

Key words: Cowpea, *Vigna unguiculata*, shrimp, *Litopenaeus vannamei*, digestibility, growth

## **Dedicatoria**

A mis padres Andrés Rivas M. (†) y Guadalupe Vega que son un ejemplo de vida.

A mis Hermanas Margarita y Julia por su apoyo incondicional.

A mi familia por su cariño.

A Dr. Julio Reyes B. (†) que siempre creyó en mí.

## Agradecimientos

Al CONACyT por la beca No. 129253, y al CESUES por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de posgrado. Al CIBNOR que a través del proyecto AC 1.15 y al proyecto SAGARPA-2003-CO2-149 apoyaron económicamente el presente trabajo.

A Roberto Civera por su amistad que es invaluable y su excelente dirección durante el desarrollo del presente trabajo.

Al comité de tesis: Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Dr. Héctor Nolasco Soria, Dr. Alfredo Hernández Llamas y con especial cariño a Dra. J. Marina Ezquerro Brauer por sus acertados comentarios que permitieron desarrollar este trabajo de investigación.

A diversas personas e instituciones que colaboraron en este trabajo: UNISON: Dra. Guadalupe Salazar, Dra. Ofelia Rouzaud y Dr. Juan Vargas; UANL: Q. Claudio Guajardo y Lic. Adriana García; CIBNOR: Dra. Elena Palacios, Dr. Bernardo Murillo y especialmente a Dra. Lucía Ocampo por su disposición y asesoría desinteresada durante el experimento de balance energético.

Al personal del CIBNOR con los que tuve la oportunidad de trabajar y aprender siempre: Sonia Rocha, Dolores Rondero, Manuel Transviña, Baudilio Acosta, Olivia Arjona y Patricia Hinojosa.

Al grupo de Nutrición por permitirme compartir largos momentos de trabajo y diversión: Roberto Civera, Ernesto Goytortúa, Alfonso Galicia, Ranferi Gutierrez, Saraí Deanda y Martín Terrazas.

A Guadalupe Leyva y Efrén Álvarez por hacer mi trabajo como si fuera suyo, pero sobre todo por su solidaridad y amistad.

A mis amigos que aunque son pocos, son de corazón y para siempre: Alejandra, Alfonso, Gloria, Saraí, Bárbara, Guadalupe, Martha, Efrén, Pedro y Graciela.

## ÍNDICE

Acta de liberación de tesis.....	i
Conformación de comités.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	v
Dedicatoria.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Índice.....	ix
Lista de tablas .....	xi
Lista de figuras .....	xiv
Lista de publicaciones.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1. Elaboración de las harinas de frijol yorimón.....	22
6.2. Caracterización química y fisicoquímica de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata L. Walp.</i> ) obtenidas por diferentes procesos.....	23
6.2.1. Análisis químicos proximales.....	24
6.2.2. Energía bruta.....	24
6.2.3. Calcio y fósforo.....	25
6.2.4. Aminoácidos totales.....	25
6.2.5. Carbohidratos.....	26
6.2.6. Características térmicas.....	26
6.2.7. Inhibidor de tripsina.....	27
6.2.8. Ácido fítico.....	27
6.2.9. Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	28
6.3. Digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas de frijol yorimón en alimentos para	

juveniles del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	29
6.4. Uso del frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata L. Walp.</i> ) en alimentos de juveniles del camarón blanco del Pacífico <i>L. vannamei</i> .....	37
6.4.2. Balance energético.....	40
6.4.2.1. Consumo de oxígeno.....	40
6.4.2.2. Excreción de amonio.....	41
6.4.2.3. Cálculos del balance energético.....	42
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1. Caracterización química y fisicoquímica de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata L. Walp.</i> ) obtenidas por diferentes procesos.....	44
7.2. Digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas de frijol yorimón en alimentos para juveniles del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> , .....	59
7.3. Uso del frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata L. Walp.</i> ) en alimentos de juveniles del camarón blanco del Pacífico <i>L. vannamei</i> .....	70
8. CONCLUSIONES .....	89
9. RECOMENDACIONES.....	91
10. LITERATURA CITADA.....	92
ANEXO I.....	112
ANEXO II .....	115
ANEXO III .....	125

## Lista de Tablas

Tabla I. Perfil de aminoácidos (g aa/ 100 g proteína) del frijol yorimón y soya.	9
Tabla II. Oligosacáridos en frijol yorimón entero y decorticado (mg/ 100 g de materia seca).	10
Tabla III. Composición de ingredientes (g/100 g de alimento) y composición proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) de los alimentos para <i>Litopenaeus vannamei</i> usados en el bioensayo de digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) entero, decorticado, cocido, germinado y extruido.	30
Tabla IV. Composición de los alimentos (g/100 g de alimento) para <i>Litopenaeus vannamei</i> con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	39
Tabla V. Composición química proximal de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) obtenidas por diferentes procesos.	46
Tabla VI. Calcio y fósforo de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) obtenidas por diferentes procesos.	47
Tabla VII. Aminoácidos totales de las harinas de frijol yorimón obtenidas por diferentes procesos.	48
Tabla VIII. Perfil de ácidos grasos de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) obtenidas por diferentes procesos.	50
Tabla IX. Actividad del inhibidor de tripsina (AIT) de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) sometidas a diferentes procesos.	51
Tabla X. Ácido fítico en harinas de frijol yorimón obtenidas con diferentes procesos.	52
Tabla XI. Entalpía y temperatura de la primera transición de harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) obtenidas por diferentes procesos.	56

Tabla XII. Digestibilidad aparente de materia seca, proteína, carbohidratos, lípidos, fósforo y energía de los alimentos elaborados con frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	61
Tabla XIII. Coeficientes de digestibilidad aparente (% $\pm$ SD <sup>1</sup> ) de materia seca, proteína cruda, carbohidratos, lípidos, fósforo y energía de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) obtenidas por diferentes procesos, en alimentos para juveniles de <i>L. vannamei</i> .	63
Tabla XIV. Actividad enzimática del extracto crudo de la glándula digestiva de camarón blanco ( <i>Litopennaeus vannamei</i> ) alimentado con las diferentes harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	69
Tabla XV. Materia seca retenida (%MSR) de los alimentos que contienen diferentes niveles de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	71
Tabla XVI. Resultados zootécnicos del nivel de inclusión de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ) en alimentos para <i>L. vannamei</i> .	73
Tabla XVII. Composición proximal (g/100 g de alimento) y de aminoácidos <sup>1</sup> de los alimentos para <i>Litopennaeus vannamei</i> con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón en sustitución de pasta de soya y harina de trigo.	75
Tabla XVIII. Actividad enzimática digestiva de <i>L. vannamei</i> alimentado por 45 días con dietas conteniendo diferentes niveles de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	78
Tabla XIX. Composición del músculo de camarón blanco del Pacífico <i>L. vannamei</i> alimentado con diferentes niveles de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	79
Tabla XX. Consumo de oxígeno post-alimentario, Incremento en calor aparente y pérdida de energía en juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón <i>V. unguiculata</i> .	81

Tabla XXI. Presupuesto de la energía metabolizable a 24 h y relación oxígeno: nitrógeno (O:N) en juveniles de *L. vannamei* alimentado con diferentes niveles de harina de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*).

### Lista de Figuras

Figura 1. Producción de camarones peneidos en México.	4
Figura 2. Producción mundial de frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i>	7
Figura 3. Microfotografía de gránulos de almidón de frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i> .	10
Figura 4. Interacciones del ácido fítico con proteínas y minerales.	12
Figura 5. Decortificador Strong & Scott 17810 <sup>MR</sup> , usado para decorticar el frijol yorimón.	22
Figura 6. Extrusor de tornillo simple Marca Brabender, modelo Do-Corder usado para extruir el frijol yorimón.	23
Figura 7. Texturómetro Instron 4465, utilizado para determinar la firmeza de los alimentos usados en el bioensayo de digestibilidad.	34
Figura 8. Sistema de respirometría utilizado para determinar el consumo de oxígeno de camarones alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero.	41
Figura 9. Termogramas de las harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) obtenidas por diferentes procesos.	54
Figura 10. Digestibilidad in vitro de las diferentes harinas de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	58
Figura 11. Relación entre la digestibilidad de carbohidratos y la entalpía de transición de las harinas de frijol yorimón sometido a diferentes procesos.	64
Figura 12. Firmeza de los alimentos con 15 % de inclusión de las harinas de frijol yorimón ( <i>V. unguiculata</i> ) elaboradas por diferentes procesos usados en el ensayo de digestibilidad in vivo para <i>L. vannamei</i> .	67
Figura 13. Curvas de crecimiento de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) durante 45 días.	74
Figura 14. Excreción de amonio de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón ( <i>Vigna unguiculata</i> ).	84

### Lista de publicaciones

- Rivas-Vega, M.E., E. Goytortúa-Bores, J.M. Ezquerra-Brauer, M.G. Salazar-García, L.E. Cruz-Suárez, H. Nolasco y R. Civera-Cerecedo. 2006. Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). Food Chemistry, 97:41-49.
- Rivas-Vega, M.E., O. Rouzaud-Sandez, M. G. Salazar-García, J. M. Ezquerra-Brauer, E. Goytortúa-Bores y R. Civera-Cerecedo. Determination of thermal characteristics of cowpea meals (*Vigna unguiculata* L. Walp.) by Differential Scanning Calorimetry and their relation with digestibility and firmness in diets for white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). Aquaculture Nutrition (sometido).

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial ha aumentado rápidamente en los últimos años, representando actualmente el 32 % por ciento de la producción pesquera total (FAO, 2006).

La producción mundial de crustáceos alcanzó el 20.8 % del valor total de la producción acuícola mundial en el 2002; en ese mismo año la producción de camarón representó el 50% de la producción mundial de crustáceos (FAO, 2006).

Para que el cultivo de camarones sea rentable y sostenible es necesario el desarrollo de “alimentos amigables con el ambiente” de alto valor nutricional y con ingredientes de bajo precio, considerando que en los sistemas intensivos de producción de camarones peneidos el alimento artificial es la fuente exclusiva de nutrientes y representa el mayor costo de operación (superior al 60%) en las granjas (Tan y Dominy, 1997; Kureshy y Davis, 2002).

El auge de la acuicultura ha propiciado un incremento en la producción de alimentos para organismos acuáticos durante los últimos años (Tacon *et al.*, 2004). La disponibilidad de ingredientes como la harina y el aceite de pescado, los cuales son los ingredientes principalmente usados en la elaboración de alimentos, representan una limitante que amenaza la sustentabilidad de la producción acuícola (Davis *et al.*, 2004).

Considerando el incremento en el costo de la harina de pescado y la incertidumbre de su disponibilidad a mediano plazo, muchos investigadores han analizado subproductos de origen animal (Abery *et al.*, 2002; Abdel-Warith, *et al.*, 2001; Xue y Cui, 2001) y vegetal (Tacon *et al.*, 1984; Kikuchi, 1999; Cruz-Suárez *et al.*, 2001) como sustitutos de la harina de pescado. Sin embargo, debido a la presencia de factores antinutricionales, su uso no ha

mostrado los niveles deseados de crecimiento (Stickney *et al.*, 1996; Brunson *et al.*, 1997). Una alternativa para eliminar o disminuir la presencia de estos factores es someter a estos insumos a procesos que permitan su empleo sin que afecten negativamente el desarrollo de los organismos acuáticos.

A pesar de esto, los subproductos de semillas de oleaginosas son la fuente de proteínas vegetales más ampliamente utilizadas en la alimentación animal por su alto contenido de proteína, su amplia disponibilidad y costo, generalmente menor al de la harina de pescado (Martínez-Palacios *et al.*, 1996).

Las semillas de leguminosas se consideran los suplementos naturales de los cereales, ya que sus niveles, generalmente altos, de lisina compensan la deficiencia en las gramíneas, mientras que éstas últimas complementan la deficiencia de metionina de las leguminosas (Tacon, 1989).

El frijol yorimón (*Vigna unguiculata L. Walp*) es una leguminosa que por muchos años se ha usado como forraje para aves y cerdos (Murillo-Amador *et al.*, 2000). Su producción mundial en el 2003 se estimó en 3,930 miles de toneladas métricas (FAO, 2006). El aumento potencial de su cultivo radica en que es una leguminosa tolerante a la sequía y salinidad (Graham y Vance, 2003). Además su semilla representa una buena fuente de proteína, ya que contiene aproximadamente 25 % (p/p) en base seca. Por otro lado, al igual que el resto de las leguminosas, presenta un buen balance de aminoácidos esenciales a excepción de la metionina, en la que es deficiente (Murillo-Amador *et al.*, 2000).

Actualmente el frijol yorimón no se usa a nivel comercial en la elaboración de alimentos para organismos acuáticos, a pesar de que se han desarrollado investigaciones encontrándose resultados alentadores. Eusebio (1991) utilizó el frijol yorimón en el alimento de *Penaeus monodon* sustituyendo 15.6% de la proteína de origen animal. En este estudio se determinó una digestibilidad aparente de proteína de 91.03 y 90.83% para la dieta conteniendo frijol yorimón sin y con cascarilla, respectivamente.

Keembiyehetty y De Silva (1993) estimaron que la harina de frijol yorimón puede sustituir la harina de pescado en un 20-30% en la dieta para tilapia. Olvera-Novoa y colaboradores (1997) utilizaron un concentrado proteico de frijol yorimón para la misma especie, encontrando resultados similares a los obtenidos con la harina integral de frijol yorimón.

La disponibilidad de los nutrientes del frijol yorimón para *Litopenaeus vannamei* aún no ha sido estudiada, y esto es importante ya que, como se mencionó anteriormente el camarón blanco del Pacífico es una de las especies de mayor interés comercial en México y a nivel mundial (Cuzon *et al.*, 2004). Con base en lo anterior, se planteó en el presente trabajo evaluar la calidad nutricional del frijol yorimón como ingrediente en alimentos balanceados para el camarón *Litopenaeus vannamei*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Producción de camarones peneidos.

Como parte del crecimiento global de la acuicultura, la producción mundial de crustáceos se ha expandido considerablemente, y se espera que esto continúe en los próximos años como respuesta al crecimiento de la población (Davis *et al.*, 2004). La producción de camarón a nivel mundial en el 2002 se estimó en 1, 292, 476 TM, siendo *Litopenaeus vannamei* la tercera especie mas cultivada en el mundo (Tacon, 2004).

En México la producción acuícola de camarón ha ido en aumento (62, 361 TM en el 2003), representando en el 2003 el 50 % del volumen de la producción total de camarón nacional (Figura 1). Sonora es el principal Estado productor de camarón en México, en el 2005 se reportó una producción de 55,652 TM (COSAES, 2005).

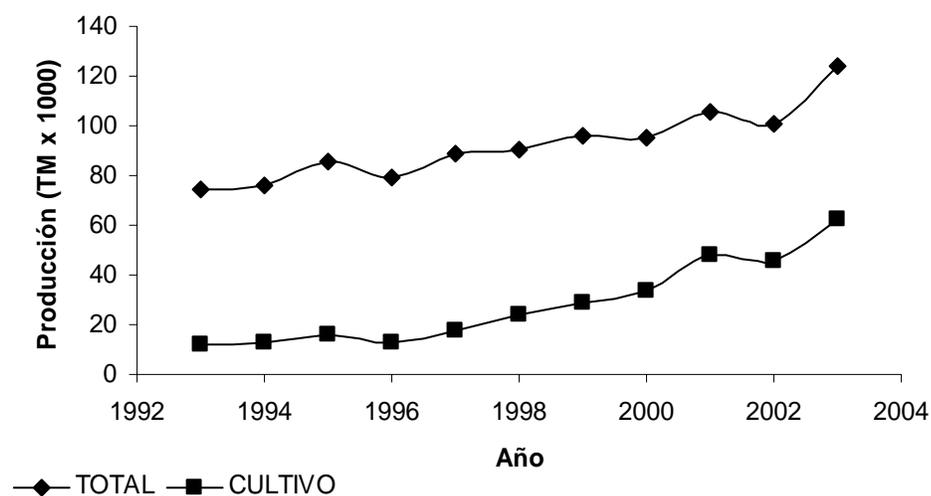


Figura 1. Producción de camarones peneidos en México (SAGARPA, 2004).

La comercialización de camarón representa para México una importante fuente de divisas, ya que el 78 % de la producción nacional es exportada a los Estados Unidos, en el 2004 las exportaciones tuvieron un valor de 327 millones de dólares (SAGARPA, 2004).

Paralelamente al crecimiento de la industria acuícola, la producción de alimento para organismos acuáticos se ha expandido.

## **2.2. Ingredientes usados para la elaboración de alimentos para organismos acuáticos.**

De igual manera que el alimento balanceado es la principal fuente de nutrientes para los organismos en cultivo, también lo es de contaminantes para el medio acuático. Los principales contaminantes potenciales originados del alimento son el fósforo, el nitrógeno, y en general, la materia orgánica. El grado de deposición de estos compuestos en el agua se ve determinado, entre otros factores, por la calidad de los ingredientes utilizados, la cantidad y calidad de los nutrientes, la calidad del proceso de elaboración de ingredientes y alimentos, así como de las estrategias de alimentación empleadas, por lo que controlando estos factores se puede lograr un alimento nutritivo, y de bajo impacto en el ambiente (Molina, 2000).

Hasta la fecha la industria acuícola depende de la harina y aceite de pescado, ya que son los ingredientes principales en la elaboración de alimentos para organismos acuáticos. Los alimentos para camarón incluyen a la harina de pescado como principal fuente de proteína, adicionándola en un 25% (p/p) de los alimentos (Cruz-Suárez *et al.*, 1998).

La harina de pescado es difícil de sustituir totalmente en los alimentos balanceados debido a sus inigualables atributos de calidad que son su contenido de aminoácidos esenciales, alta

digestibilidad y la ausencia de factores antinutricionales que pueden estar presentes en otras fuentes proteicas (Romero *et al.* 1994), pero la tendencia actual es buscar fuentes de nutrientes alternas, para disminuir la dependencia de la harina de pescado (Cuzon *et al.*, 2004, Fox *et al.*, 2004, Murray 2004).

Dentro de los ingredientes vegetales, las oleaginosas y principalmente la soya, son cada vez más comunes en la alimentación de organismos acuáticos, por su composición química, perfil de aminoácidos, alto contenido de vitaminas y menor costo que la harina de pescado. Una ventaja de la soya es que su utilización primaria es para obtener aceites; la pasta derivada de ese proceso incrementa su valor proteico en términos de porcentaje de peso seco, y en consecuencia su uso para la acuicultura resulta adecuado. A nivel comercial, la pasta de soya ha tomado un lugar importante, ya que se incluye de manera rutinaria en los alimentos balanceados para organismos acuáticos (Martínez-Palacios *et al.*, 1996); sin embargo, su costo se ha elevado significativamente en nuestro país (com. pers. Zendejas, Agribands-Purina, 2004).

Debido a la demanda de soya, se ha hecho necesaria la identificación de fuentes de proteínas alternativas, inclusive para este ingrediente; entre éstas destacan las semillas de lupino, chícharos (*Pisum sp.*), y frijol (*Vigna sp.*) ya que son leguminosas y pueden funcionar como sustitutos naturales de la soya (Olvera y Oliveira, 2000).

### **2.3. Importancia y composición química del frijol yorimón.**

El frijol yorimón (*Vigna unguiculata L Walp*), es una leguminosa originaria de África, mundialmente conocida como cowpea, pero se cultiva también en Latino América, Asia y

Estados Unidos. Este frijol se siembra en un amplio rango de condiciones climáticas que van desde las semiáridas hasta las subhúmedas (Murillo-Amador *et al.*, 2000).

El frijol yorimón es una leguminosa que por muchos años se ha usado como forraje para aves y cerdos (Murillo-Amador *et al.*, 2000). Su producción mundial en el 2005 fue de 3,689 miles de toneladas métricas (Figura 2) (FAO, 2006). El aumento potencial de su cultivo radica en que es una leguminosa tolerante a la sequía y salinidad (Graham y Vance, 2003).

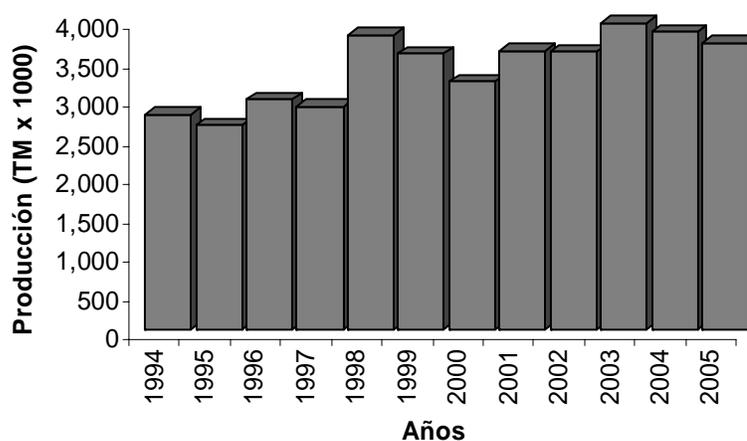


Figura 2. Producción mundial de frijol yorimón *Vigna unguiculata*. (FAO, 2005).

En la actualidad no se tienen cifras oficiales de la producción de frijol yorimón en México. Las principales áreas de producción son Tamaulipas, Baja California Sur, Sur de Sonora y Norte de Sinaloa (Díaz y Ortegon, 1997, Murillo-Amador *et al.*, 2000). En estos Estados su producción forma parte de los cultivos tradicionales, y su explotación es principalmente para autoconsumo (Murillo-Amador *et al.*, 2000).

### ***Proteínas y aminoácidos***

El contenido de proteína cruda del frijol yorimón varía entre 19 y 26 % (p/p) en peso seco, y se ha visto que esta variación se debe a la variedad, condiciones de cultivo y proceso. Eusebio (1991) reporta que por efecto del decortinado, la proteína del frijol yorimón aumentó 20 %. A pesar de que existen leguminosas con mayor contenido de proteína como lupino (42 % (p/p)), se considera al frijol yorimón como fuente de proteína.

Las proteínas del frijol yorimón están constituidas por dos fracciones importantes: las tipo globulinas, que constituyen el 90 %; sin embargo, esta fracción es insoluble en agua, pero soluble en soluciones salinas diluidas; por otro lado, el 10 % restante, de la fracción proteica, esta constituido por las albúminas, que son solubles en agua y en soluciones salinas diluidas (Murillo-Amador *et al.*, 2000).

Kochhar *et al.* (1988) encontraron que el contenido de aminoácidos del frijol yorimón, a excepción de la prolina, se ve afectado por la variedad de la semilla. En la Tabla I se muestra el perfil de aminoácidos de 10 variedades de frijol yorimón y soya.

Como es de esperarse, el frijol yorimón al ser una leguminosa es deficiente en metionina y rica en lisina, ambos aminoácidos esenciales para crustáceos. Esta característica particular convierte a las leguminosas en suplementos naturales de los cereales, ya que sus niveles generalmente altos de lisina compensan la deficiencia en las gramíneas, mientras que éstas últimas complementan la insuficiencia de metionina de las leguminosas (Tacon, 1989).

**Tabla I. Perfil de aminoácidos (g aa/100 g proteína) del frijol yorimón y soya.**

Aminoácido	Frijol yorimón <sup>1</sup>	Soya <sup>2</sup>
Ácido aspártico	10.7-12.91	-
Ácido glutámico	16.2-18.7	-
Alanina	4.1-4.8	-
Arginina	5.4-8.0	5.42
Fenilalanina	5.5-6.2	3.60
Glicina	3.8-4.6	-
Histidina	2.9-4.7	2.46
Isoleucina	-	4.51
Leucina	7.6-8.5	6.81
Lisina	6.6-8.1	5.66
Metionina	1.5-2.3	1.28
Prolina	3.2-4.9	-
Serina	4.1-5.6	-
Tirosina	2.2-3.6	1.67
Triptófano	-	1.35
Valina	4.9-5.7	-

<sup>1</sup>Kochhar *et al.* (1988); <sup>2</sup>Glencross (2001).

### ***Carbohidratos***

Los carbohidratos en semillas vegetales se componen de azúcares simples, almidones y fibra dietaria. Se ha visto que la utilización de carbohidratos como fuente de energía, por los organismos acuáticos varía mucho, y que son menos eficientes que los organismos terrestres (D' Abramo *et al.*, 1997).

Las leguminosas contienen aproximadamente 45-65% (p/p) de almidón, siendo el componente principal. La Figura 3 muestra la microfotografía de los gránulos de almidón del frijol yorimón; que son de forma irregular, ovals o en forma de riñón. Longe (1980) evaluó 10 variedades de frijol yorimón, encontrando que el contenido de almidón varía entre 37 y 42 % (p/p).

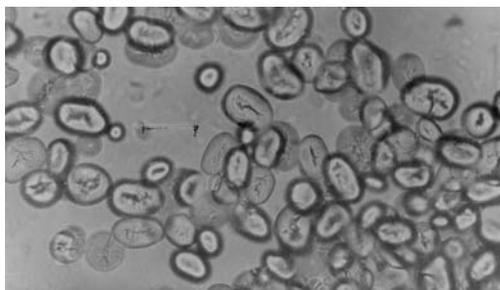


Figura 3. Microfotografía de gránulos de almidón de frijol yorimón *Vigna unguiculata*. Agunbiade y Longe (1999).

El oligosacárido en mayor concentración en el frijol yorimón es estaquiosa, seguido por rafinosa (Tabla II).

**Tabla II. Composición de oligosacáridos en frijol yorimón entero y decorticado (mg/100 g de materia seca)** Sefa-Dedeh *et al.* (2001).

<b>Frijol yorimón</b>	<b>Rafinosa</b>	<b>Estaquiosa</b>	<b>Maltosa</b>
Entero	0.552	2.545	0.118
Decorticado	0.63	3.661	0.051

La fibra dietaria incluye a un grupo de carbohidratos tales como lignina y polisacáridos no almidonosos (PNA) solubles en agua (pectinas,  $\beta$ -glucanos, alginatos, etc.) e insolubles en agua (celulosa) (Fennema, 1996). Los PNA son considerados factores antinutricionales, ya que obstruyen la acción de las enzimas digestivas y afectan la velocidad de tránsito de los alimentos por el tracto digestivo (Francis *et al.*, 2001). En las semillas de leguminosas se

encuentran principalmente en la cascarilla. Lecuona-Villanueva y colaboradores (2001) encontraron que el almidón del frijol yorimón contenía 14.1 % (p/p) de PNA, de los cuales 12.1 % pertenece a los PNA solubles en agua.

### ***Lípidos***

El contenido de lípidos del frijol yorimón es muy bajo (0.42-1.3% en base seca), además se ha reportado que existen diferentes contenidos de lípidos entre las variedades y las condiciones ambientales durante el cultivo (Eusebio, 1991, Oluwatosin, 1997, Garg *et al.*, 2002, Tshovhote *et al.*, 2003).

Se ha reportado que el frijol yorimón presenta el siguiente perfil de ácidos grasos: ácido mirístico 0.07%, ácido palmítico 3.54%, ácido araquidónico 0.26% y ácido behénico 0.33% (Puzon y Rivero, 1997).

### ***Factores antinutricionales***

#### **Ácido fítico**

El ácido fítico (Hexafosfato de mio-inositol) es un compuesto común en semillas, y tiene la capacidad de quelar minerales tales como calcio, zinc, cobre y hierro, volviendo indisponibles a estos minerales para los organismos que los consumen. Además, el fitato también forma complejos proteína-fitato (Martínez *et al.*, 2002) (Figura 4), y no puede ser bien digerido por los organismos acuáticos, lo que provoca que el fósforo que contiene sea bioindisponible para éstos.

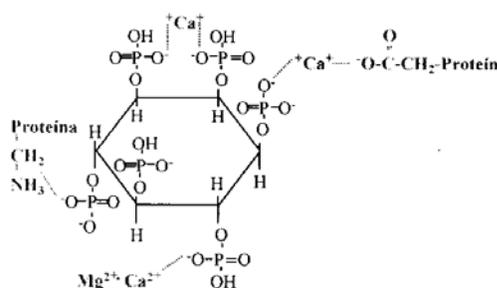


Figura 4. Interacciones del ácido fítico con proteínas y minerales (Martínez *et al.*, 2002).

Ologhobo y Fetuga (1984) encontraron que el contenido de ácido fítico para 10 variedades de frijol yorimón es de 0.31 % de materia seca, el contenido de ácido fítico es bajo si se compara con el reportado para lupino (0.5 %), gluten de maíz (1.2 %) y pasta de soya (1.7 %) (Glencross, 2001, Murray, 2004).

### Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son muy comunes en productos vegetales, principalmente en leguminosas. El más importante es el inhibidor de tripsina, se ha reportado que en la soya hay 2 grupos de inhibidores: inhibidor de tripsina Kunitz que es termolábil y ácidolábil, y el inhibidor de tripsina Bowman-Birk que es más estable (Francis *et al.*, 2001).

Angharad y colaboradores (1980) encontraron que el frijol yorimón presenta 2 fracciones importantes: un inhibidor activo solo con tripsina, y un inhibidor activo con tripsina y quimotripsina, siendo más abundante el primero. Además reportan que estos inhibidores son moléculas diméricas, enlazadas con enlaces disulfuro, por lo que cada molécula tiene la capacidad de enlazar solamente a una molécula de tripsina o quimotripsina.

Se ha reportado que la actividad del inhibidor de tripsina varía con la variedad de frijol yorimón (Kochhar *et al.*, 1988), y que ésta desaparece completamente por el tratamiento térmico, por lo que se cree que no contiene la fracción Bowman-Birk que es resistente a altas temperaturas como sucede con la soya (Ologhobo y Fetuga, 1984).

### Taninos

Los taninos se definen funcionalmente como compuestos polifenólicos solubles en agua que tienen la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. Se clasifican en taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables que consisten en una molécula glucosídica enlazada a diferentes complejos fenólicos (Von Ele y Schwartz, 1996).

Su efecto antinutricional es interferir con los procesos digestivos formando complejos con enzimas o nutrientes como proteínas y minerales. También reducen la absorción de la vitamina B<sub>12</sub> (Francis *et al.*, 2001). El contenido de taninos en el frijol yorimón es de 0.56 g/100g de materia seca, y no se considera de significancia nutricional (Ologhobo y Fetuga, 1984).

### Lectinas

Las lectinas, también conocidas como fitohemaglutininas, se encuentran en muchas leguminosas y tienen la capacidad de enlazar reversiblemente a los carbohidratos (Francis *et al.*, 2001). Se ha reportado que el frijol yorimón es relativamente alto en fitohemaglutininas (60 Unidades de hemaglutinina/mg de proteína) al igual que la soya, y

debido a su naturaleza termolábil es completamente removida por efecto del tratamiento térmico, además de que existe una amplia variación en su contenido debido a la variedad, de tal manera que es posible clasificarlas como cultivos de medio y bajo contenido de fitohemaglutininas (Ologhobo y Fetuga, 1984; Francis *et al.*, 2001).

#### **2.4. Efectos del procesamiento sobre la calidad nutricional de ingredientes vegetales en alimentos acuícolas.**

Los ingredientes vegetales con potencial para ser usados en alimentos acuícolas pueden contener una amplia variedad de factores antinutricionales, los cuales se ha visto que tienen efectos biológicos negativos en peces, principalmente en el crecimiento y consumo de alimento (Francis *et al.*, 2001).

Estos efectos pueden ser disminuidos o evitarse con el uso de procesos tecnológicos que ayuden a disminuir los factores antinutricionales, y a la vez hagan más disponibles los nutrientes de los ingredientes vegetales. En alimentos para peces y crustáceos se ha usado principalmente el proceso de extrusión (Cruz-Suárez *et al.*, 2001, Davis y Arnold, 2000, Gomes *et al.*, 1993, Gouveia y Davies 2000, Satoh *et al.*, 1998, Cheng y Hardy, 2003), decorticado (Booth *et al.*, 2001, Cruz-Suárez *et al.*, 2001, Davis *et al.*, 2002, Eusebio, 1991, Sudaryono *et al.*, 1999) y el tratamiento térmico (Garg *et al.*, 2002, Thiessen *et al.*, 2003 Urbano *et al.*, 2003), entre otros.

Cheng y Hardy (2003) encontraron que la extrusión de pasta de soya, gluten de maíz y trigo entero mejoró significativamente la digestibilidad de materia seca, lípidos y la digestibilidad expresada en términos de energía en alimentos para trucha arcoiris. La

extrusión de harina de canola ocasionó una disminución del 30 % del contenido de ácido fítico, mayor ganancia de peso y mayor consumo de alimento al incluirse en 30 % en alimentos para salmón (Satoh *et al.*, 1998). Mientras que Cruz-Suárez *et al.* (2001) reportaron que la extrusión del chícharo *P. sativum* mejoró significativamente el factor de conversión alimenticia y la eficiencia proteica de alimentos para *L. stylirostris*, en tanto que los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca de las harinas extruidas enteras y decorticadas presentaron niveles altos (91.3 y 92.4 % respectivamente) debido a la gelatinización de los almidones ocasionada por el proceso de extrusión.

Se ha probado el efecto del decorticado en varios ingredientes en alimentos para camarón con distintos resultados. Se ha reportado que el decorticado del chícharo *Pisum sativum* no mejora su calidad nutricional para *L. vannamei* (Davis *et al.*, 2002) ni para *L. stylirostris* (Cruz-Suárez *et al.*, 2001), probablemente por que la cascarilla no contiene niveles altos de factores antinutricionales. Eusebio (1991) encontró que el decorticado del frijol yorimón y del frijol *Phaseolus calcaratus* no afectó el crecimiento de *Penaeus monodon*, pero si mejoró significativamente la digestibilidad de proteína de *Phaseolus calcaratus*.

El tratamiento térmico tiene la ventaja de destruir los factores antinutricionales termolábiles (Inhibidor de tripsina, inhibidor de quimitripsina y lectinas) y la de gelatinizar los almidones de los ingredientes vegetales. Thiessen y colaboradores (2003) reportaron que la digestibilidad de carbohidratos del chícharo *P. sativum* aumentó significativamente por el tratamiento en autoclave a 125° C por 15 min, en alimentos para trucha arcoiris *O. mykiss*. Por otro lado, Garg y colaboradores (2002) utilizaron la soya (*Glycine max*) tratada térmicamente a 121 ° C por 30 min en alimentos para carpa, encontrando que el

procesamiento térmico mejoró significativamente el crecimiento de los organismos, y disminuyó significativamente la actividad del inhibidor de tripsina, aunque no se reporta si existe correlación entre el crecimiento y la actividad del inhibidor de tripsina.

## **2.5. Usos del frijol yorimón.**

A pesar de que el frijol yorimón en lo general, se cultiva principalmente para el consumo humano como grano seco, en algunos países africanos y asiáticos sus hojas se consumen cocidas o deshidratadas. Las hojas son una fuente importante de minerales como Fósforo, Calcio y Hierro; vitaminas como ácido ascórbico y ácido fólico (Nielsen *et al.*, 1997).

Las semillas se usan como complemento para animales, la materia seca se ensila y se mezcla con otros granos como el maíz y el sorgo y se usa en alimentación de cerdos (Murillo-Amador *et al.*, 2000). Tshovote y colaboradores (2003) probaron el frijol yorimón en alimentos avícolas y encontraron que la digestibilidad de los aminoácidos fue por arriba del 75 %.

Son pocos los estudios relacionados con la utilización del frijol yorimón en alimentos para organismos acuáticos. Se ha usado como ingrediente en alimentos para tilapia con buenos resultados, aunque no se obtuvo un crecimiento satisfactorio al reemplazar completamente a la harina de pescado. Keembyehetty y De Silva (1993) determinaron que la sustitución en un rango de 20-33% de la harina de pescado con frijol yorimón permite un buen crecimiento de la tilapia.

Olvera-Novoa y colaboradores (1997) evaluaron un producto a base de frijol yorimón (concentrado proteico) obtenido a través de un proceso químico de extracción del almidón,

por medio del cual concentró la proteína a 64.31% (p/p) en peso seco, y se eliminaron algunos factores antinutricionales, en especial el inhibidor de tripsina. Al utilizar ese concentrado proteico se observó que una sustitución de la harina de pescado del 20 al 30 % presentó buen crecimiento de la tilapia, y una sustitución del 40 % presentó una buena eficiencia proteica.

En el caso de crustáceos, el valor nutricional del frijol yorimón solo ha sido evaluado en *Penaeus monodon*. Eusebio (1991) reemplazó a la pasta de soya en alimentos con 40 % de proteína, 10 % extracto etéreo y 32 % de carbohidratos, evaluó la digestibilidad *in vivo* de proteína y el crecimiento de esta especie, encontrando que la inclusión del frijol no afecta negativamente la digestibilidad del alimento con respecto al alimento control, y mantiene una digestibilidad aparente de proteína de 90.83 %. De manera similar, se obtuvo buen crecimiento y supervivencia por lo que se considera que el frijol yorimón es un ingrediente que puede ser utilizado en el alimento de esta especie, y probablemente para otras especies de camarones como el camarón blanco.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El alimento en la producción acuícola de camarón es el insumo más importante desde el punto de vista económico, ya que representa hasta el 60 % de los costos de producción, y desde el punto de vista ecológico, es la principal fuente de contaminantes al medio acuático.

La calidad del alimento depende principalmente de la calidad de los ingredientes, del proceso de elaboración y del manejo en granja. La tendencia actual en la investigación en nutrición acuícola, es la búsqueda de ingredientes disponibles, baratos y de alta calidad. Estas investigaciones se han enfocado básicamente a la evaluación de ingredientes vegetales, ya que no presentan sobreexplotación como sucede con la harina de pescado.

Desde un contexto nacional, el valor de la producción acuícola del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, convierte a esta actividad en la más importante en el Noroeste de México, por esto se considera importante desarrollar investigación aplicada a la evaluación de ingredientes vegetales regionales, que permitan diversificar las opciones de insumos para la formulación, así como para eventualmente disminuir el costo del alimento, pero que a la vez sean digeribles para el camarón, evitando así descargas de nutrientes en los efluentes.

El frijol yorimón es una leguminosa tolerante a la sequía y a la salinidad, y por ello ha despertado el interés de los productores para cultivarlo en el Noroeste de México. El frijol yorimón ha sido empleado con éxito en alimentación humana y animal en países Africanos, Asiáticos y en Estados Unidos (Murillo-Amador *et al.*, 2000). Sin embargo, su uso en

acuacultura es aún escaso. En respuesta a esto y a lo expuesto anteriormente, se considera de gran importancia evaluar al frijol yorimón como ingrediente en alimentos para camarón blanco del Pacífico, evaluando su calidad nutricia.

#### 4. HIPÓTESIS

Los procesos tecnológicos como el decortinado, cocido, germinado y extruido del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walper) ocasionan una disminución de los factores antinutricionales, y aumentan la digestibilidad de proteínas y carbohidratos para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

El contenido de proteínas y carbohidratos del frijol yorimón permite que sea incluido en el alimento balanceado en sustitución de ingredientes vegetales como la pasta de soya y la harina de trigo, sin afectar negativamente la supervivencia, crecimiento, factor de conversión alimenticia, eficiencia proteica y balance energético del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Conocer el valor nutricional del frijol yorimón (*Vigna unguiculata L. Walp.*) para su inclusión en alimentos para camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

### Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los procesos de decortinado, cocción, germinado y extrusión del frijol yorimón (*Vigna unguiculata L. Walp.*) sobre su contenido de fósforo, calcio, aminoácidos totales, ácidos grasos, inhibidor de tripsina, ácido fítico, composición proximal y sus características térmicas.
2. Determinar la digestibilidad de proteína *in vitro* y la digestibilidad *in vivo* de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de harinas de frijol yorimón en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*.
3. Determinar el efecto de la inclusión del frijol yorimón, sometido a diferentes procesos (decortinado, cocción, germinación y extrusión) en alimentos balanceados, sobre la actividad enzimática digestiva del camarón *L. vannamei*.
4. Conocer el efecto de la inclusión de la harina de frijol yorimón en sustitución de la pasta de soya y harina de trigo en alimentos para *L. vannamei* sobre el crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticia, eficiencia proteica, actividad enzimática digestiva, consumo de oxígeno y excreción de amonio.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Elaboración de las harinas de frijol yorimón.

El frijol yorimón (*Vigna unguiculata L. Walp.*) entero (FYE) se obtuvo en Álamos, Sonora, México. La vegetación en este lugar es selva baja caducifolia, con temperaturas promedio durante el mes de Octubre de 31 ° C, y humedad de 20 %, el suelo es migajón arenoso. El riego fue por temporal, la cosecha del grano seco fue en Octubre del 2003, la cosecha se realizó manualmente y se empacó en costales de polietileno con capacidad de 50 Kg, no se usó tratamiento para su conservación (Productores de frijol, com. pers.). El frijol yorimón fue sometido a los siguientes procesos:

1) Decortinado (FYD); se usó un decortificador Strong & Scott 17810<sup>MR</sup>, Chicago, IL, USA (Figura 5).

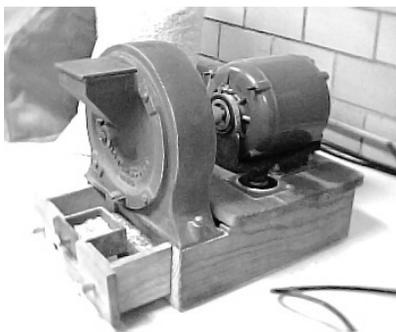


Figura 5. Decortificador Strong & Scott 17810<sup>MR</sup>, usado para decorticar el frijol yorimón.

2) Cocido (FYEC); primero se remojó en agua destilada (1:10 frijol:agua) durante 105 minutos a temperatura ambiente, para luego ser cocido a ebullición durante 20 minutos usando una relación frijol: agua de 1:10 (Anduaga-Cota *et al.*, 2002), posteriormente se secó en una estufa con aire seco a 40°C por 24 horas.

3) Germinado (FYG); se llevó a cabo en recipientes rectangulares de plástico sobre papel filtro húmedo, en una cámara de germinación Biotronette Mark III, Lab-Line®, en

completa oscuridad a 33 ° C y 50 % de humedad relativa, durante 3 días. Posteriormente, se secó en una estufa con aire seco a 40 ° C por 24 horas.

4) Extruido (FYEX); se pulverizó el frijol y se preconditionó con una humedad del 22 %, a 4 ° C durante 12 horas. La extrusión se llevó a cabo en un extrusor de tornillo simple Marca Brabender, modelo Do-Corder (Figura 6), con una temperatura de entrada de 80 ° C y de salida de 180 ° C, 10-12 bares de presión.



Figura 6. Extrusor de tornillo simple Marca Brabender, modelo Do-Corder usado para extruir el frijol yorimón.

Los productos obtenidos se molieron en un pulverizador PULVEX 200, México, D. F. Las harinas se tamizaron a 250 micras y se almacenaron a 4 ° C hasta su análisis.

## **6.2. Caracterización química y físicoquímica de las harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.) obtenidas por diferentes procesos.**

La calidad nutricional de los ingredientes está determinada, en gran parte, por el contenido de nutrientes y la presencia de factores antinutricionales. A través del uso de los diferentes procesos tecnológicos descritos anteriormente se espera incidir en estas características.

Se determinó el efecto del tipo de procesamiento sobre la composición química proximal, su contenido energético, y de calcio, fósforo, aminoácidos totales, ácidos grasos, inhibidor de tripsina y ácido fítico; así como sus características térmicas y la digestibilidad *in vitro* de las diferentes harinas elaboradas a partir de frijol yorimón. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

### **6.2.1. Análisis químicos proximales.**

El contenido de humedad, proteína, extracto etéreo, cenizas y fibra de las harinas de frijol yorimón se determinó siguiendo la metodología descrita por la AOAC (1990). La humedad se determinó por diferencia de peso; el contenido de cenizas se determinó por calcinación en mufla a 550°C; para la cuantificación de proteína bruta se utilizó un digestor y un destilador automático Tecator, siguiendo el método de microkjeldhal; el extracto etéreo se cuantificó utilizando un sistema Soxtec Avanti, utilizando éter de petróleo como solución extractora; el contenido en fibra cruda se determinó por hidrólisis sucesiva, ácida y básica (ácido sulfúrico e hidróxido de sodio), con un equipo Fibertec.

El extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia, usando la siguiente ecuación:

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ Extracto etéreo} + \% \text{ Fibra cruda} + \% \text{ Cenizas})$$

### **6.2.2. Energía bruta.**

Para el cálculo de la energía bruta se usó un calorímetro adiabático Marca Parr, Modelo 1261 (Illinois, USA). Se elaboraron pastillas usando aproximadamente 1 g de muestra, se secaron a 70 ° C durante 12 horas, se colocaron en crisoles de acero inoxidable. Se colocó

10 cm de alambre Níquel-Cobre, de tal manera que tocaba la muestra y se procedió a la combustión con oxígeno. Los líquidos obtenidos de la combustión de la muestra se titularon con carbonato de sodio 0.725 N, usando naranja de metilo como indicador, y se midió la cantidad de alambre Níquel-Cobre quemado durante la combustión.

### **6.2.3. Calcio y Fósforo.**

Para determinar el contenido de calcio y fósforo se calcinaron 0.5 g de las diferentes harinas a 550 ° C por 24 horas; después las cenizas se solubilizaron en 1.5 mL de HCl 12 N y se aforaron a 25 mL con agua deionizada. Se analizó el contenido de calcio usando un espectrofotómetro de absorción atómica GBC modelo Avanta PM a una longitud de onda de 239 nm, usando óxido nitroso-acetileno (Sapp y Davidson, 1991). El fósforo se cuantificó colorimétricamente, usando el método del color amarillo del complejo vanadomolibdofosfórico en un sistema acidificado con ácido nítrico al 70 %, y la lectura fue en espectrofotómetro de microplaca Marca Labsystems, Modelo Multiscan Ascent (Jackson, 1958).

### **6.2.4. Aminoácidos totales.**

Los aminoácidos totales se determinaron hidrolizando 3 mg de muestra por 4 horas a 150 ° C, en 3 mL de HCl 6 N. El ácido se retiró liofilizando las muestras, y éstas se resuspendieron en 1 mL de buffer de citrato de sodio 0.2 M pH 2.2. Los aminoácidos hidrolizados fueron analizados usando un HPLC Agilent Technology <sup>MR</sup>, Modelo 1100 Series. Fase Movil: Fase A. Acetato de sodio 0.1 M pH 7.2: Metanol: Tetrahidrofurano (90:9.5:1). Fase B. Metanol, se inyectó 10 µL de muestra a un flujo de 1.4 mL/minuto. Se

usó una columna Microsorb Short-One RP C-18, la detección fue por fluorescencia a 340 y 455 nm (Gandolfi, 1981, Umagat *et al.*, 1982, Jones y Gilligan, 1983).

#### **6.2.5. Carbohidratos.**

Se usó el método de antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) (Dreywood, 1946). Se pesó 0.1 g de muestra y se hidrolizó con 3 mL de HCl 2 N durante 60 minutos a 100 ° C. A 1 mL del hidrolizado se le adicionó 2 mL del reactivo de antrona (2 mg antrona/mL de ácido sulfúrico concentrado), se calentó la mezcla a 80 ° C por 15 minutos, se enfrió en baño de hielo, y se leyó absorbancia a 630 nm. Se corrió una curva estándar con glucosa para determinar la concentración de carbohidratos.

#### **6.2.6. Características térmicas.**

La calorimetría diferencial de barrido es un análisis térmico que ha permitido identificar las transiciones y modificaciones de la estructura del gránulo de almidón, verificar la asociación de fragmentos de amilosa y amilopectina e identificar los cambios en sus características térmicas como consecuencia de tratamientos combinados de calor y humedad (Biliaderis, 1992).

Las características térmicas de las harinas se determinaron en un calorímetro de barrido diferencial DSC-7 de Perkin–Elmer. El equipo se calibró usando Indio y Zinc como estándares. Las muestras se pesaron (5-15 mg, peso húmedo) y fueron hidratadas en un exceso de humedad (200%) en crisoles de acero inoxidable y se sellaron herméticamente. Un crisol vacío y sellado se utilizó como referencia. El barrido de temperatura se llevó cabo desde 26°C hasta 145°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/minuto. El cambio de

entalpía total ( $\Delta H$ , J/g) necesario para que ocurra la transición de fase, se estimó midiendo el área bajo la curva de la endoterma. Se registró también, la temperatura máxima del pico.

#### **6.2.7. Inhibidor de tripsina.**

Se determinó la actividad del inhibidor de tripsina siguiendo la metodología descrita por Kakade y colaboradores (1974) utilizando Benzoil-Arg-*p*-Nitroanilida (BAPNA) (SIGMA # cat. B4875) como sustrato (0.92 mM en buffer de Tris 0.05 M/0.02 M CaCl<sub>2</sub>, pH 8.2). La muestra de harina de frijol yorimón se sometió a una extracción por 3 horas en NaOH 0.01 N, el pH se mantuvo alrededor de 9.0. Se mezclaron 2 mL del extracto con 2 mL de solución de tripsina tipo I de páncreas bovino (SIGMA # cat. T-8003), 0.002 % (p/v) en HCl 0.001 M, la reacción se inició al adicionar 5 mL del sustrato a 37 ° C. Después de 10 minutos, la reacción se detuvo con 1 mL de ácido acético 30%. Se corrió a la vez un blanco utilizando la misma mezcla de reacción pero se adicionó el ácido acético antes que el sustrato. La mezcla de reacción se filtró en papel filtro (Whatman No. 3) y se leyó la absorbancia a 410 nm. La actividad se interpretó como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción, y se expresa como las unidades de tripsina inhibidas por mg de muestra seca (UTI/ mg de muestra) ó UTI/ mg de proteína.

#### **6.2.8. Ácido fítico.**

Para la determinación de ácido fítico se usó 1 g de muestra, el ácido fítico se extrajo durante 30 minutos con 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 3 %, con agitación constante. Las muestras se centrifugaron a 1500 g a 10 ° C durante 10 minutos. El ácido fítico fue precipitado como fitato férrico de 10 mL del sobrenadante con una solución de FeCl<sub>3</sub> (2 mg de ión férrico/mL en TCA al 3 %) calentando a ebullición durante 45 minutos.

El precipitado se lavó 2 veces con 25 mL de TCA, y una vez con agua, el precipitado se convirtió a fitato de sodio y  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  por la adición de 3 mL de NaOH 1.5 N. El  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  se filtró con papel filtro No. 2, se disolvió en ácido nítrico 3.5 N, y el fierro del precipitado fue cuantificado colorimétricamente usando tiocianato de potasio 1.5 M y leyendo absorbancia a 480 nm (Wheeler y Ferrel, 1971). Se usó una curva estándar de 0 a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fierro. El fósforo fítico se calculó usando una relación 4 Fe: 6 P, el ácido fítico se calculó asumiendo que contiene 28.16 % de fósforo.

#### **6.2.9. Digestibilidad *in vitro*.**

Se determinó la digestibilidad *in vitro* de las harinas de frijol yorimón siguiendo el método AOAC (1990) y por el método AOAC modificado por el Laboratorio Torry, donde un gramo de muestra se incubó con una solución de pepsina 0.0002% (SIGMA # cat. P-7000) en ácido clorhídrico 0.075 N por 16 horas a 45 ° C. Se usó un blanco sin pepsina en todos los casos.

La solución de reacción se filtró en papel filtro (Whatman No. 2) para retener la fracción insoluble, a la cual se le determinó el contenido de proteína utilizando el método Kjeldahl.

La digestibilidad se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{g Proteína residual sin pepsina} - \text{g Proteína residual con pepsina}}{\text{g Proteína residual sin pepsina}} * 100$$

Para el análisis de datos se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía, a fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos, y una posterior comparación de medias de Tukey, cuando existieron diferencias significativas, con un nivel de confianza

del 95 %, usando el paquete estadístico STATISTICA<sup>MR</sup> 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok, USA).

### **6.3. Digestibilidad *in vivo* de las diferentes harinas de frijol yorimón en alimentos para *L. vannamei*.**

Se llevó a cabo la evaluación de la digestibilidad *in vivo* de las harinas de frijol yorimón. Se formuló un alimento control con un contenido de proteína del 35%, usando el software MIXIT-WIN<sup>®</sup> (Agricultural Software Consultants, Inc., San Diego, Ca, USA). A partir de este alimento control se diseñaron 5 alimentos experimentales a los cuales se le incluyó 15 % (p/p) de cada una de las harinas experimentales (Tabla III).

Los alimentos se elaboraron en la planta de alimentos del CIBNOR. Los ingredientes sólidos fueron molidos en un pulverizador (PULVEX Mod.200) y tamizados a través de un tamiz de 250 µm. Los macroingredientes secos (harina de sardina, pasta de soya, harina integral de trigo y harinas de frijol yorimón) se mezclaron durante 8 minutos en una mezcladora Kitchen Aid<sup>MR</sup>, y la mezcla de microingredientes (vitamina C, cloruro de colina, fosfato dibásico, colesterol, harina de kelp, gluten de trigo, óxido de cromo, premezcla de vitaminas y premezcla de minerales) se adicionó posteriormente, mezclando durante 8 minutos mas. Se hizo una emulsión con el aceite de pescado, BHT y lecitina de soya, misma que fue incorporada a la mezcla de ingredientes secos y mezclada durante 5 minutos.

**Tabla III. Composición de ingredientes (g/100 g de alimento) y composición proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) de los alimentos para *Litopenaeus vannamei* usados en el bioensayo de digestibilidad *in vivo* de las harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*) entero, decorticado, cocido, germinado y extruido.**

INGREDIENTE	ALIMENTO					
	Control	Entero	Decorticado	Cocido	Germinado	Extruido
Entero crudo <sup>1</sup>	–	15.00	–	–	–	–
Decorticado <sup>1</sup>	–	–	15.00	–	–	–
Cocido <sup>1</sup>	–	–	–	15.00	–	–
Germinado <sup>1</sup>	–	–	–	–	15.00	–
Extruido <sup>1</sup>	–	–	–	–	–	15.00
Harina integral de trigo <sup>2</sup>	35.93	30.49	30.49	30.49	30.49	30.49
Pasta de soya <sup>2</sup>	25.00	21.21	21.21	21.21	21.21	21.21
Harina de sardina <sup>2</sup>	20.00	16.97	16.97	16.97	16.97	16.97
Harina de Kelp <sup>2</sup>	4.00	3.39	3.39	3.39	3.39	3.39
Gluten de trigo <sup>3</sup>	3.77	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20
Aceite de pescado <sup>4</sup>	3.00	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
Lecitina de soya <sup>5</sup>	3.00	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
Premezcla de vitaminas <sup>6</sup>	1.80	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
Fosfato dibásico de sodio <sup>7</sup>	1.20	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
Colesterol <sup>8</sup>	0.50	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
Premezcla mineral <sup>9</sup>	0.50	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
Cloruro de colina 62 % <sup>10</sup>	0.20	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Vitamina C, Stay C 35% <sup>2</sup>	0.090	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076
BHT <sup>11</sup>	0.004	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034
Óxido de cromo <sup>12</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>Composición proximal<sup>13</sup></b>						
Humedad	6.63±0.05	5.98±0.02	7.27±0.11	6.89±0.12	6.30±0.14	6.76±0.10
Proteína cruda	33.9±0.16	32.5±0.01	32.2±0.39	32.8±0.30	33.4±0.42	33.5±0.26
Extracto etéreo	8.47±0.04	7.15±0.05	7.07±0.08	7.43±0.03	7.00±0.01	6.87±0.10
Fibra cruda	1.74±0.21	1.64±0.36	1.01±0.03	1.45±0.28	0.94±0.01	1.94±0.08
Cenizas	15.9±0.05	14.6±0.05	15.7±0.09	15.2±0.12	14.9±0.15	15.3±0.06
E.L.N. <sup>14</sup>	47.4	38.2	36.7	36.2	37.4	35.7
Energía (kJ/g) <sup>15</sup>	19.36	17.35	17.18	17.05	17.26	17.10

Tabla III (Continuación)

<sup>1</sup> Sierra de Álamos, Sonora, México, <sup>2</sup> Promotora Industrial Acuasistemas, S.A., La Paz, BCS, México, <sup>3</sup> Gluten y almidones industriales S.A. de C. V., México, D. F., <sup>4</sup> Aceite de hígado de bacalao, Farmacia Paris, S.A. de C.V. México, D.F., <sup>5</sup> ODONAJI, Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C. V. México, D.F. <sup>6</sup> Composición de la premezcla vitamínica (g/kg premezcla): Vit. A (20,000 UI/g) 5.6, D<sub>3</sub> (850,000 UI/g) 0.001, DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate (250 UI/g) 8.9, Menadione 2.2, Thiamin-HCl 0.6, Riboflavin 3.3, Pyridoxine-HCl 1.1, DL-Ca-Pantothenate 5.6, nicotinic acid 5.6, Biotin 0.1, Inositol 5.6, B<sub>12</sub> 0.002, folic acid 0.2, alpha-celulose 961.4. <sup>7</sup> SIGMA # cat. S-0876. <sup>8</sup> SIGMA # cat. C-8503, <sup>9</sup> Composición de la premezcla mineral (g/100 g de premezcla): CoCl<sub>2</sub> 0.004, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.25, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 28.398, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.65, KI 0.067, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.01, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 13.193, alfa-celulosa 53.428. <sup>10</sup> Roche, D.F. México, <sup>11</sup> Butylated hydroxytoluene, ICN # cat. 101162, <sup>12</sup> Aldrich # cat. 20,216-9. <sup>13</sup> Los valores son los promedios de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. <sup>14</sup> Extracto libre de nitrógeno. <sup>15</sup> Calculado a partir de los valores energéticos: Proteína = 23.4 kJ/g, Lípidos = 39.8 kJ/g, Carbohidratos = 17.2 kJ/g.

Una vez homogeneizados los ingredientes, se agregó agua caliente a aproximadamente 50 % del peso de la masa de cada alimento, mezclando durante 3 minutos. La masa resultante fue extruida en dos ocasiones en un molino de carne (TOR-REY<sup>MR</sup> Monterrey, N.L., México) para obtener pellets de 2 mm de diámetro, mismos que fueron cortados manualmente y secados a con flujo de aire a 40 ° C durante 12 horas.

Para el bioensayo de digestibilidad se utilizaron organismos juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, provenientes del Laboratorio de Genética del CIBNOR, con un peso promedio inicial de  $15.4 \pm 0.9$  g, distribuyéndose aleatoriamente a razón de 5 organismos por acuario (60 L) en tres acuarios por tratamiento. Durante el experimento se mantuvieron las siguientes condiciones:  $27.1 \pm 0.01$  ° C,  $39.7 \pm 0.00$  unidades prácticas de salinidad (ups) y  $4.4 \pm 0.01$  mg/mL de oxígeno disuelto. Los organismos fueron alimentados durante 7 días con los alimentos experimentales antes de iniciar la colecta de heces, misma que se hizo por sifoneo una hora después de cada alimentación. Las heces se lavaron con agua destilada y se congelaron hasta su análisis. La alimentación se realizó 3 veces por día (9:00, 12:00 y 15:00 horas). Al final del bioensayo (28 días) se liofilizaron las heces colectadas de cada tanque (aproximadamente 6 g de heces húmedas) y se les determinó el contenido de óxido crómico por el método de Olvera-Novoa (1994), en donde

50 mg de muestra se digirieron con 5 mL de ácido nítrico 90 % en un digestor Tecator (Modelo DS12, serie 959), y después con ácido perclórico concentrado a 300 ° C, hasta la aparición de un anillo rojo en la superficie de la solución, después de aforar a 25 mL, se leyó la absorbancia a 350 nm.

Para determinar lípidos totales en alimentos y heces se tomaron 100 mg de heces o alimento finamente molido y se le agregó 6.3 mL de la mezcla metanol:cloroformo:agua (2:1:0.8; v:v:v) como primer solución extractora, se agitó en vortex, y se dejó en reposo a 4 ° C durante 12 horas, después de este tiempo se agitó en vortex y se centrifugó a 1000 g rpm por 10 minutos, el residuo se sometió a una doble extracción con 5 mL de metanol:cloroformo. Se centrifugó y se separó la mezcla cloroformo:lípidos, y la fracción metanol:agua:lípidos residuales se sometió a un doble lavado con cloroformo. La mezcla cloroformo:lípidos se sometió a un proceso de evaporación, los lípidos residuales se recuperaron utilizando 1 mL de cloroformo para ser vertidos en viales. El cloroformo se evaporó utilizando una corriente de nitrógeno (Folch-Lees y Sloane-Stanley, 1957). El porcentaje de lípidos totales se obtiene por diferencia entre el peso de la muestra inicial con lípidos y el peso de los lípidos recuperados, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Lípidos totales} = \frac{\text{Peso lípidos recuperados (g)}}{\text{Peso de la muestra antes de la extracción (g)}} * 100$$

El contenido de proteína, carbohidratos y fósforo de alimentos y heces se determinó usando los métodos descritos para las harinas de frijol yorimón (Secciones 6.2.1, 6.2.3. y 6.2.5.).

Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de materia seca, proteína, carbohidratos, lípidos, calcio y fósforo de los alimentos, se determinó usando las siguientes fórmulas (Maynard *et al.*, 1981):

$$\text{CDA de materia seca (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en alimentos}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} \right) * 100 \right]$$

$$\text{CDA de nutrientes (\%)} = 100 - 100 \left[ \left( \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en alimento}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} \right) * \left( \frac{\% \text{ Nutriente en heces}}{\% \text{ Nutriente en alimento}} \right) \right]$$

Los Coeficientes de Digestibilidad Aparente de los Ingredientes (CDAI) fueron calculados usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{CDAI de materia seca (\%)} = \frac{(100 * \% \text{ CDA materia seca en alimento}) - (85 * \% \text{ CDA materia seca en alimento control})}{15}$$

$$\text{CDAI de nutrientes (\%)} = \frac{(100 * \% \text{ CDA nutriente alimento de prueba}) - (85 * \% \text{ CDA nutriente alimento control})}{15}$$

A los alimentos usados en el ensayo de digestibilidad se les determinó el porcentaje de materia seca retenida (Estabilidad en el agua). Para esto, se pesaron 2 g de alimento, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 200 mL de agua marina a 40 ups. Después de 1 hora de inmersión con agitación constante a 100 rpm y 27 ° C, el contenido del matraz se filtró a través de papel filtro Whatman No. 3. El papel filtro con el alimento residual se secó en una estufa con flujo de aire a 105 ° C por 24 horas (Obaldo *et al.*, 2002).

Para calcular la estabilidad del alimento se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia seca retenida} = \frac{\text{Peso seco del alimento final (g)}}{\text{Peso seco del alimento inicial (g)}} * 100$$

Para determinar la influencia de la firmeza de los alimentos en la digestibilidad de los mismos para juveniles de *L. vannamei*, se midió firmeza usando el método 66-50 de la American Association of Cereal Chemists (AACC). Los alimentos se remojaron durante 30 minutos con agua destilada. Se utilizó un texturómetro Instron 4465 (Figura 7).

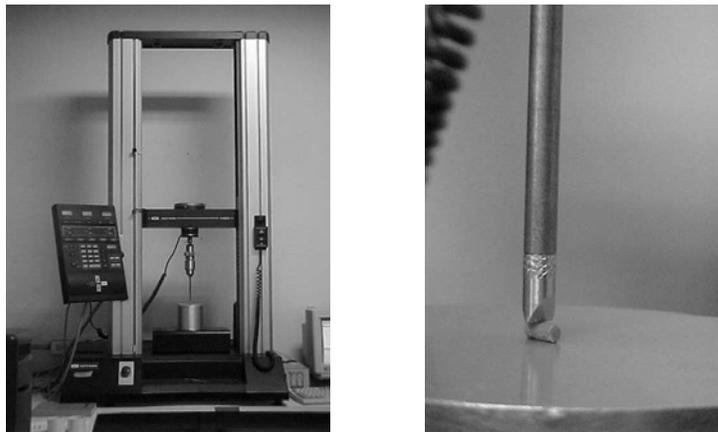


Figura 7. Texturómetro Instron 4465, utilizado para determinar la firmeza de los alimentos usados en el bioensayo de digestibilidad.

Se usó una cuchilla de 1 mm de espesor, a una velocidad de corte de 1 mm/min, con 50 % de deformación del diámetro del alimento. Se usaron pellets de 2.75 mm de diámetro y 5.91 mm de longitud promedio.

Al finalizar el bioensayo se identificaron los estadios de muda en base a la setogénesis de los urópodos, para lo cual se utilizó un microscopio estereoscópico. Se seleccionaron 6 organismos por tratamiento en estadio de intermuda C, se separaron las glándulas

digestivas y se les determinó proteína soluble y la actividad enzimática. Para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas la muestra de cada tratamiento se homogenizó en un homogeneizador (Marca PRO Scientific Inc. Modelo RRSO2, CT, USA) en 3 volúmenes de agua destilada, posteriormente se centrifugó a 11,300 g a 4 ° C por 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de proteína soluble, actividad enzimática de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina,  $\alpha$ -amilasa y lipasa, para determinar el efecto de la inclusión de las harinas de frijol yorimón sometido a diferentes tratamientos.

### **Proteína soluble**

A 1 mL de la muestra se le adicionó 200  $\mu$ L del reactivo Bradford, y se leyó absorbancia a 595 nm. Los resultados se reportan como mg proteína/mL de extracto protéico, corriéndose a la vez una curva estándar con albúmina (Bradford, 1976).

### **Proteasas alcalinas totales**

Se utilizó como sustrato azocaseína (SIGMA # cat. A-2765) al 1% en Buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Se mezcló en vortex 0.5 mL del buffer con 0.5 mL de azocaseína al 1 %, corriendo un blanco a la vez. La reacción se inició al agregar 10  $\mu$ L del extracto y se detuvo a los 10 minutos agregando 0.5 mL de ácido tricloroacético 20%. Al blanco se le agregó ácido tricloroacético antes que el sustrato. Se centrifugó a 16,500 g por 5 minutos a 4 ° C y se leyó la absorbancia a 440 nm. La actividad es reportada como (Abs<sub>440</sub>/min)/mg de proteína (Erlanger *et al.*, 1961).

### **Actividad Tipo-Tripsina**

Se usó como sustrato BAPNA. El sustrato se disolvió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para hacer 1 mM, y se aforó a 100 mL con buffer TRIS 50 mM pH 7.5, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM. A 1.25 mL de la solución de sustrato se le agregó 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, después de 10 minutos se detuvo la reacción con 0.25 mL de ácido acético 30%, y se leyó la absorbancia a 410 nm. La actividad de tripsina es reportada como unidades de actividad  $(\text{Abs}_{410}/\text{min})(1000)(\text{volumen de la mezcla de reacción})/(8800*\text{mg de proteína})$ , donde 8800 es el coeficiente de extinción molar de la *p*-Nitroanilida (Erlanger *et al.*, 1961).

### **Actividad Tipo-quimotripsina**

La actividad Tipo-Quimotripsina se midió usando Succinyl-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Phe-*p*-Nitroanilida (SAPNA) (SIGMA # cat. S-7388) como sustrato. Se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de la preparación enzimática a una solución conteniendo 50  $\mu\text{L}$  de sustrato (SAPNA 0.02 mM) y 590  $\mu\text{L}$  de una solución amortiguadora TRIS-HCl a pH 7.8 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, después de 5 minutos, la reacción se detuvo agregando 0.25 mL de ácido acético al 30 % a 37 ° C. Se leyó la absorbancia a 410 nm. Una unidad de actividad tipo quimotripsina se reporta como:  $(\text{Abs}_{410}/\text{min})(1000)(\text{volumen de la mezcla de reacción})/(8800*\text{mg de proteína})$ , donde 8800 es el coeficiente de extinción molar de la *p*-Nitroanilida (García-Carreño *et al.*, 1994).

### **Actividad de amilasa**

Se usó almidón soluble (SIGMA # cat. S-9765) como sustrato; se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, 500  $\mu\text{L}$  de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), y 500  $\mu\text{L}$  de almidón

soluble al 1 % (p/v). Después de 10 minutos de incubación a 37 ° C, se adicionaron 200 µL de carbonato de sodio 2 N, y 1.5 mL de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (SIGMA # cat. D-1510), se agitaron los tubos en vortex y se calentaron a ebullición en baño María por 15 minutos, posteriormente se adicionaron 7.3 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia a 550 nm, y se corrió un blanco a la vez. Las unidades de amilasa se reportan como: (Abs<sub>550</sub>/min)/ mg de proteína (Vega-Villasante *et al.*, 1993).

### **Actividad de lipasa**

Se usó β-Naftil caprilato (SIGMA # cat. N-8875) como sustrato; se mezclaron 100µL de taurcolato de sodio 100 mM, 1900 µL de buffer Tris 50 mM pH 7.2, 10 µL del extracto enzimático y 20 µL de β-Naftil caprilato 200 mM. Después de 30 minutos de incubación a 37 ° C, se le adicionó a la mezcla de reacción 20 µL de Fast Blue BB (SIGMA # cat. F-3378) 100 mM, y después de 5 minutos, se le agregó 200 µL de ácido tricloroacético 0.72 N y 2.71 mL de etanol:acetato de etilo (1:1). Se leyó la absorbancia a 540 nm. Las unidades de lipasa se reportan como: (Abs<sub>540</sub>/min)/mg de proteína (Versaw *et al.*, 1989).

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 3 réplicas para todas las determinaciones enzimáticas. Para el análisis de datos se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía, a fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos, y una posterior comparación de medias de Tukey, cuando existieron diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95 %. Se usó el paquete estadístico STATISTICA<sup>MR</sup> 7.0. (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok, USA).

#### **6.4. Uso del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como ingrediente en alimentos de juveniles del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*.**

##### 6.4.1. Bioensayo de crecimiento.

Se formularon 5 alimentos isoprotéicos e isolipídicos con 35% de proteína y 8 % de lípidos, usando el software MIXIT-WIN<sup>®</sup>. Un alimento control y 4 experimentales en los cuales se incluyó la harina de frijol yorimón entero al 15, 30, 45 y 60 %, sustituyendo a una mezcla de pasta de soya y harina de trigo (1:2) en 25, 50, 75 y 100 %, respectivamente (Tabla IV).

Los alimentos se elaboraron como se mencionó en el apartado 6.3. Las condiciones de cultivo durante el bioensayo de crecimiento fueron:  $27.05 \pm 0.05$  °C de temperatura, 40 ups de salinidad,  $5.1 \pm 0.11$  mg/L de oxígeno disuelto y se realizó un recambio de agua al día de aproximadamente 60%. Se distribuyeron aleatoriamente 10 organismos con peso promedio de  $0.78 \pm 0.05$  g de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) por acuario, usando 4 réplicas por tratamiento.

El alimento fue distribuido en dos raciones al día (50 % a las 10:00 y 50 % a las 17:00 hrs.). Al inicio del bioensayo, el alimento se suministró a razón del 10 % de la biomasa en cada acuario. Posteriormente, la cantidad de alimento suministrado fue corregida diariamente en base al alimento residual, procurando que siempre hubiera un poco de éste, por lo que los organismos fueron alimentados a saciedad aparente.

**Tabla IV. Composición en ingredientes de los alimentos (g/100 g de materia seca, excepto humedad) para *Litopenaeus vannamei* con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón en sustitución de pasta de soya y harina de trigo.**

Ingrediente	Alimento				
	Control	15 %	30 %	45 %	60 %
Harina de frijol yorimon entero <sup>1</sup>	0.00	15.00	30.00	45.00	60.00
Harina integral de trigo <sup>2</sup>	40.00	30.00	20.00	10.00	0.00
Pasta de soya <sup>2</sup>	20.00	15.00	10.00	5.00	0.00
Harina de sardina <sup>2</sup>	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Aceite de pescado <sup>2</sup>	4.41	4.41	4.41	4.41	4.41
Lecitina de soya <sup>3</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Alginato de sodio <sup>4</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla vitaminas <sup>5</sup>	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Fosfato dibásico de sodio <sup>6</sup>	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Colesterol <sup>7</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Premezcla de minerales <sup>8</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina 62% <sup>9</sup>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C 35% a.a. <sup>2</sup>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
BHT <sup>10</sup>	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004

<sup>1</sup>Sierra de Álamos, Sonora, México, <sup>2</sup>Promotora Industrial Acuasistemas, S.A., La Paz, BCS, México, <sup>3</sup> ODONAJI, Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C. V. México, D.F. <sup>4</sup> Aldrich # cat. 180947, <sup>5</sup> Composición de la premezcla vitamínica (g/kg premezcla): Vit. A 5, D<sub>3</sub> 0.001, E 8, Menadiona 2, B<sub>1</sub> 0.5, B<sub>2</sub> 3, B<sub>6</sub> 1, DL-Ca-Pantotenato 5, ácido nicotínico 5, H 0.05, Inositol 5, B<sub>12</sub> 0.002, ácido fólico 0.18, Alfa-celulosa 865.266. <sup>6</sup> SIGMA # cat. S-0876. <sup>7</sup> SIGMA # cat. C-8503, <sup>8</sup> Composición de la premezcla mineral (g/100 g de premezcla): CoCl<sub>2</sub> 0.004, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.25, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 28.398, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.65, KI 0.067, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.01, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 13.193, alfa-celulosa 53.428. <sup>9</sup> Roche, D.F. México, <sup>10</sup> Butylated hydroxytoluene, ICN # cat. 101162.

Se realizaron biometrías cada 15 días, durante 45 días que duró el experimento. Al finalizar se pesó a cada uno de los organismos, se identificaron los estadios de muda, en base a la setogénesis de los urópodos, para lo cual se utilizó un microscopio estereoscópico. Se seleccionaron los organismos en estadio de intermuda C, se separaron los músculos

caudales y las glándulas digestivas, y se les determinó la composición química y actividad enzimática, respectivamente. Los criterios para evaluar los diferentes tratamientos fueron: ganancia en peso, supervivencia, tasa relativa de crecimiento, alimento consumido, eficiencia proteica y factor de conversión alimenticia. Se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{No. de organismos final}}{\text{No. de organismos inicio}} * 100$$

$$\text{Tasa relativa de crecimiento (\%)} = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Peso inicial (g)}} * 100$$

$$\text{Factor de conversion alimenticia} = \frac{\text{Alimento total consumido (g)}}{\text{Incremento en peso corregido (g)}}$$

Incremento en peso corregido (IPC) =

$$\text{Biomasa final} + \left( \frac{\text{Peso promedio final} + \text{Peso promedio inicial}}{2} * \text{No. de muertos} \right) - \text{Biomasa inicial}$$

$$\text{Eficiencia proteica (EP)} = \frac{\text{Incremento en peso (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

#### **6.4.2. Balance energético.**

Al término del bioensayo de crecimiento, se procedió a hacer un estudio de balance energético con los organismos que fueron alimentados con los alimentos experimentales.

#### 6.4.2.1. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió usando un sistema cerrado de respirometría, en donde el volumen de agua se mantuvo constante durante el experimento (Ocampo, 1998).

Los organismos se mantuvieron en ayuno durante 24 horas antes de iniciar la medición del consumo de oxígeno.

El sistema de respirometría consistió en recipientes de 2 L inmersos en un baño María con temperatura constante (28 °C) por medio de calentadores sumergibles, colocando un organismo por recipiente (Figura 8). Cada recipiente se mantuvo con aireación constante, durante las 24 horas de ayuno, después de este tiempo se hizo un recambio del agua del 100 %, y se les suministró el alimento. Después de 1 hora de alimentación, se iniciaron las mediciones del consumo de oxígeno usando para ello un oxímetro digital YSI<sup>MR</sup> Modelo 57 con precisión de 0.01 mg/ml (Yellow Springs, OH, USA) durante 4 horas.



Figura 8. Sistema de respirometría utilizado para determinar el consumo de oxígeno de camarones alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero.

Después de la evaluación del consumo de oxígeno se midieron los pesos húmedos de cada organismo. La tasa de consumo de oxígeno fue determinada por la pendiente de la regresión lineal del oxígeno disuelto sobre el tiempo, posteriormente se ajustó con el peso de los organismos, el volumen de agua en los recipientes y el consumo promedio de los blancos. Los resultados del consumo de oxígeno se expresaron como tasas metabólicas masa específica ( $\text{mgO}_2/\text{g}$  de camarón/h). Los resultados de excreción de amonio se transformaron a tasa de excreción masa-específica ( $\mu\text{moles}$  de amonio total/ g de camarón/h). Las regresiones lineales y el análisis de varianza se realizaron por medio del paquete STATISTICA 7.0. (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

#### **6.4.2.2. Excreción de amonio**

Para determinar la excreción de amonio se tomaron 2 mL del agua usada en los recipientes con los organismos alimentados y no alimentados, después de 4 horas.

La concentración total de amonio fue determinada por la técnica de flujo-inyección de gases (Hunter y Uglow, 1993). Se utilizó una solución de hidróxido de sodio 0.01 M que fue usada como base para transformar el  $\text{NH}_3$  y que pueda pasar a través de una membrana de teflón semipermeable-acarreador y el azul de bromotimol 0.4 g/L, usando como indicador de pH. Se usó una bomba peristáltica (Gilson Miniplus 312) a un flujo de 1 mL/min. Se midió la altura de los picos de muestras individuales de soluciones con concentración conocida de sulfato de amonio para construir una curva de calibración.

### 6.4.2.3. Cálculos del balance energético.

Las tasas de ingestión de los camarones, estimadas en el ensayo de crecimiento, se convirtieron a Joules/día, considerando el contenido energético de los alimentos elaborados con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón (Tabla IV). El consumo de oxígeno con cada alimento es convertido a valores de energía usando el equivalente de energía de oxígeno 14.3 J/mg (Lucas, 1993).

Para estimar la energía destinada al crecimiento, se usó la tasa de crecimiento de los organismos durante los 45 días que duró el ensayo de crecimiento, obteniendo la pendiente de la curva de crecimiento en g/día y convirtiendo estos valores a energía considerando el contenido de energía bruta del músculo determinada usando una bomba calorimétrica, como se describió en la sección 6.2.2.

Con la conversión a valores energéticos del alimento ingerido, consumo de oxígeno y crecimiento, se estimó un balance energético considerando las siguientes ecuaciones (Lucas, 1993):

Energía asimilada= Energía para respiración + Energía para crecimiento

% Eficiencia neta de retención= Energía para crecimiento/ Energía asimilada \* 100

Estas ecuaciones se basan en que, en los organismos que están sexualmente inmaduros, de la energía que es asimilada, después de ser usada en el metabolismo, una parte es usada para la producción de biomasa.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 réplicas en todos los casos. Para el análisis de los datos se llevó a cabo un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas utilizando las pruebas de Lilliefors y Bartlett. Como los datos no fueron normales, se llevó a cabo un análisis no paramétrico, usando Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos; cuando esto sucedió, se llevó a cabo una comparación de medianas. Se usó un nivel de confianza del 95 %. Usando el paquete estadístico STATISTICA<sup>MR</sup> 7.0. (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización química y fisicoquímica de las harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata L. Walp.*) obtenidas por diferentes procesos.

En la Tabla V se presenta la composición química proximal de las harinas de frijol yorimón sometidas a diferentes tratamientos. El contenido de proteína varió de 25.55 a 29.51 % (p/p) en peso seco. El contenido de fibra cruda de la harina de frijol yorimón entero fue de 2.60 % (p/p), y disminuyó significativamente con todos los tratamientos, siendo de 0.70 % (p/p) en la harina de frijol yorimón extruido. La harina de frijol yorimón germinado presentó el mayor nivel de cenizas (4.23 % (p/p)).

A pesar de que se ha reportado que el contenido de proteína se ve afectado por las condiciones de cultivo, la variedad y factores ambientales (Tshovhote *et al.*, 2003; Oluwatosin, 1997), en el presente trabajo la proteína de la harina de frijol entero (26.14 % (p/p) peso seco) coincide con lo reportado para otras variedades de frijol yorimón (Tshovhote *et al.*, 2003; Kochhar *et al.*, 1988; Eusebio, 1991). Por efecto de la germinación el contenido de proteína aumentó en la harina del frijol yorimón, esto se atribuye a que durante la germinación la producción de enzimas para el proceso de crecimiento se incrementa, además el consumo de los carbohidratos, como energía destinada a los procesos de crecimiento, ocasiona la concentración de proteínas (Sunday *et al.*, 2001).

El extracto etéreo de la harina de frijol entero fue de 1.05 % (p/p), y aumentó significativamente a 1.64 y 1.40 % (p/p) en las harinas de frijol yorimón cocido y germinado, respectivamente. El contenido de lípidos del frijol yorimón coincide con lo

reportado para otras variedades (0.42-1.30 % (p/p)) (Tacon, 1989, Eusebio, 1991). El contenido de lípidos disminuyó significativamente en la harina de frijol yorimón decorticado (0.80 % (p/p)), este comportamiento no ha sido reportado para otras leguminosas decortizadas (Eusebio, 1991, Cruz-Suárez *et al.*, 2001). El contenido de fibra de la harina de frijol yorimón entero (2.60 % (p/p)) es menor que el reportado para otras variedades (4.42-6.34 % (p/p) en peso seco) (Tshovhote *et al.*, 2003; Tacon, 1989; Eusebio, 1991). En el presente estudio, se observó que por efecto de todos los procesos la fibra disminuyó significativamente.

**Tabla V. Composición química proximal de las harinas de frijol yorimón (HFY) obtenidas por diferentes procesos.**

<b>Ingrediente</b>	<b>Humedad</b>	<b>Proteína Cruda</b>	<b>Extracto Etéreo</b>	<b>Fibra Cruda</b>	<b>Cenizas</b>	<b>ELN<sup>1</sup></b>
HFY Entero	7.92 <sup>c</sup> ±0.96	26.14 <sup>ab</sup> ±0.27	1.05 <sup>b</sup> ±0.01	2.60 <sup>d</sup> ±0.2	3.93 <sup>b</sup> ±0.14	66.28
HFY Decorticado	7.85 <sup>c</sup> ±0.04	25.55 <sup>a</sup> ±0.10	0.80 <sup>a</sup> ±0.009	1.29 <sup>b</sup> ±0.04	3.75 <sup>b</sup> ±0.07	68.61
HFY Cocido	6.98 <sup>b</sup> ±0.11	27.29 <sup>b</sup> ±0.15	1.64 <sup>d</sup> ±0.10	1.92 <sup>c</sup> ±0.13	2.85 <sup>a</sup> ±0.02	66.3
HFY Germinado	6.36 <sup>a</sup> ±0.04	29.51 <sup>c</sup> ±1.17	1.40 <sup>c</sup> ±0.04	2.12 <sup>c</sup> ±0.01	4.23 <sup>c</sup> ±0.02	62.74
HFY Extruido	6.83 <sup>b</sup> ±0.04	25.56 <sup>a</sup> ±0.20	0.96 <sup>b</sup> ±0.02	0.70 <sup>a</sup> ±0.09	3.76 <sup>b</sup> ±0.02	62.19

<sup>1</sup> Extracto libre de nitrógeno; Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 g de materia seca, excepto humedad. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

El contenido de calcio varió de 0.10 a 0.13 % (p/p) en las harinas de frijol yorimón, y puede considerarse bajo (Tabla VI), ya que para otras variedades se ha reportado de 1.0 a 1.5 % (p/p) de calcio. El contenido de fósforo para la harina de frijol yorimón entero fue de 0.55 % (p/p), este nivel es ligeramente mas alto que el reportado por otros autores para frijol yorimón (0.3 a 0.41% (p/p)) (Murillo-Amador *et al.*, 2000, Tacon, 1989, Tshovhote *et al.*, 2003). Estas diferencias se atribuyen a las condiciones de calidad del suelo donde fueron cultivados, ya que se ha visto que esto influye en el contenido de minerales (Glencross, 2001).

**Tabla VI. Contenido de calcio y fósforo en las harinas de frijol yorimón (HFY) obtenidas por diferentes procesos.**

<b>Ingrediente</b>	<b>Calcio (%)</b>	<b>Fósforo (%)</b>
HFY Entero	0.12 <sup>a</sup> ±0.001	0.55 <sup>ab</sup> ±0.02
HFY Decorticado	0.12 <sup>a</sup> ±0.002	0.56 <sup>ab</sup> ±0.02
HFY Cocido	0.10 <sup>b</sup> ±0.002	0.52 <sup>b</sup> ±0.00
HFY Germinado	0.10 <sup>b</sup> ±0.005	0.58 <sup>a</sup> ±0.01
HFY Extruido	0.13 <sup>a</sup> ±0.004	0.59 <sup>a</sup> ±0.02

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 g de materia seca.

El contenido de aminoácidos totales de las harinas de frijol yorimón se muestra en la Tabla VIII. Los aminoácidos predominantes en la harina de frijol yorimón entero son ácido aspártico, ácido glutámico y arginina (12.41, 21.75 y 10.26 g/100 g proteína respectivamente) y el que se encuentra en menor cantidad es la metionina con 1.45 g/100 g proteína.

**Tabla VII. Contenido de aminoácidos totales (g/100 g proteína) en las harinas de frijol yorimón (HFY) obtenidas por diferentes procesos.**

Aminoácido	HFY				
	Entero	Decorticado	Cocido	Germinado	Extruido
Ácido aspártico	12.41	11.17	12.44	17.36	11.96
Ácido glutámico	21.75	18.51	19.42	18.39	19.02
Alanina	5.89	4.65	5.10	5.14	5.23
Arginina	10.26	8.67	8.99	8.90	8.46
Fenilalanina	4.71	4.91	5.26	5.33	4.98
Glicina	7.04	5.06	5.52	5.28	5.50
Histidina	4.33	3.47	3.61	3.65	3.53
Isoleucina	4.93	4.45	5.04	4.91	4.90
Leucina	8.49	7.67	8.51	8.23	8.23
Lisina	6.74	6.76	7.04	6.17	7.06
Metionina	1.45	1.53	1.53	1.44	1.54
Serina	5.05	3.52	3.17	4.06	3.74
Tirosina	2.55	2.96	2.15	2.42	2.74
Treonina	4.44	3.52	3.70	3.94	3.69
Valina	5.20	5.01	5.18	5.72	5.30

El contenido de aminoácidos obtenidos en todas las harinas coinciden con lo encontrado para frijol yorimón por otros autores (Kochhar *et al.*, 1988, Murillo-Amador *et al.*, 2000, Tshovhote *et al.*, 2003), a excepción de la arginina, ya que se ha reportado que el frijol yorimón contiene aproximadamente 6 g/100 g de proteína, y en nuestro estudio

encontramos que para la harina de frijol yorimón entero fue de 10.26, aunque disminuyó hasta 8.46 g/100 g de proteína en la harina de frijol yorimón extruido. En general, las leguminosas son deficientes en metionina, pero con buenos niveles de lisina, esto se ha visto también en soya y lupino (Kochhar *et al.*, 1988, Tacon, 1989, Murillo-Amador *et al.*, 2000, Glencross, 2001, Tshovhote *et al.*, 2003).

Considerando los niveles de aminoácidos recomendados para camarones por Akiyama y colaboradores (1991), la metionina es el aminoácido limitante en la harina de frijol yorimón en el alimento para *L. vannamei*, ya que se recomienda 2.4 g/100g de proteína, y la harina de frijol entero contiene 1.45 g/100g proteína.

La Tabla VIII muestra el perfil de ácidos grasos de las harinas de frijol yorimón. A pesar de que el frijol yorimón no es rico en lípidos, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados es de 49.9 %.

Puzón y Rivero (1997) reportaron que el ácido graso predominante en el frijol yorimón es el ácido palmítico (16:0), en nuestros resultados, se observa que los ácidos grasos predominantes son el ácido palmítico y ácido linoléico para todos los tratamientos. El frijol yorimón presenta niveles muy altos de ácidos grasos saturados (41.1 % (p/p)), comparado con el 17.6 y 14.4 % (p/p) que se reporta para lupino y soya (Glencross 2001).

**Tabla VIII. Perfil de los principales<sup>1</sup> ácidos grasos (g/100 de materia seca) de las harinas de frijol yorimón (HFY) obtenidas por diferentes procesos.**

Ácido graso	HFY				
	Entero	Decorticado	Cocido	Germinado	Extruido
16:0	0.6	0.7	0.8	0.7	0.6
18:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
18:1n-9	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1
18:2n-6	0.7	0.7	1.1	0.9	0.6
18:3n-3	0.3	0.4	0.6	0.5	0.3
Total de saturados	41.4	40.3	35.0	34.8	44.0
Total de monoinsaturados	8.7	7.7	8.3	7.9	6.2
Total de poliinsaturados	49.9	52.0	56.8	57.4	49.9
Total de n-6	33.9	34.1	36.0	36.0	33.5
Total de n-3	16.0	17.9	20.8	21.4	16.4
(n-3)/(n-6)	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5

<sup>1</sup> El resto de los ácidos grasos presentes tuvieron niveles menores del 0.1 g/100 g de materia seca.

### ***Actividad del inhibidor de tripsina***

La Tabla IX muestra la actividad del inhibidor de tripsina en las harinas de frijol yorimón. La actividad en la harina de frijol yorimón entero crudo (31.62 UTI/ mg proteína) es mayor que el reportado para 10 variedades de frijol yorimón por Ologhobo y Fetuga (1984) (23.7 UTI/mg proteína), pero menor que el reportado para frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de 10.86 UTI/mg muestra (Dhurandhar y Chang, 1990) y para soya de 105.48 UTI/mg de muestra (Kakade *et al.*, 1974).

Se observa una disminución significativa del inhibidor de tripsina (IT) por efecto de la cocción a ebullición durante 20 minutos, aunque esta no desapareció totalmente. Ologhobo y Fetuga (1984) reportan que con 15 minutos de cocción, el IT en el frijol yorimón

desaparece, esta diferencia puede atribuirse a los diferentes métodos de cocción empleados, ya que ellos emplearon un cocedor con presión de 15 Lb/pulg<sup>2</sup>, donde se da el efecto combinado de temperatura-presión sobre los constituyentes del frijol.

**Tabla IX. Actividad del inhibidor de tripsina (AIT) de las harinas de frijol yorimón (HFY) sometidas a diferentes procesos.**

<b>Ingrediente</b>	<b>AIT (UTI<sup>1</sup>/mg muestra seca)</b>	<b>AIT (UTI<sup>1</sup>/mg proteína<sup>2</sup>)</b>
HFY Entero	7.52 <sup>c</sup> ±0.34	31.62 <sup>cd</sup> ±1.46
HFY Decorticado	7.70 <sup>c</sup> ±0.28	33.38 <sup>d</sup> ±1.24
HFY Cocido	2.68 <sup>b</sup> ±0.14	10.69 <sup>b</sup> ±0.56
HFY Germinado	7.92 <sup>c</sup> ±0.36	28.79 <sup>c</sup> ±1.34
HFY Extruido	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Unidades de Tripsina Inhibida. <sup>2</sup> Proteína en base seca. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

En el caso de la harina de frijol extruido la actividad del inhibidor de tripsina no se detectó, debido a las condiciones de presión y temperatura (80-180° C, 10-12 bares) durante este proceso y a la naturaleza termolábil de este inhibidor que lo inactivan completamente (Fennema, 1996).

### *Ácido fítico*

La harina de frijol yorimón entero presentó 0.53 % (p/p) en base seca de ácido fítico (Tabla X). Ologhobo y Fetuga (1984) encontraron 0.31 % (p/p) en base seca, en promedio, al analizar el contenido de ácido fítico en 10 variedades de frijol yorimón.

**Tabla X. Ácido fítico en harinas de frijol yorimón (HFY) obtenidas con diferentes procesos.**

<b>Ingrediente</b>	<b>Ácido fítico (g/100 g materia seca)</b>	<b>% de remoción</b>
HFY Entero	0.53 <sup>a</sup> ±0.04	
HFY Decorticado	0.52 <sup>a</sup> ±0.05	1.9
HFY Cocido	0.47 <sup>ab</sup> ±0.05	11.3
HFY Germinado	0.35 <sup>c</sup> ±0.04	34.0
HFY Extruido	0.40 <sup>bc</sup> ±0.03	24.5

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Si comparamos estos resultados con el contenido de ácido fítico de otros ingredientes vegetales tales como la pasta de soya (1-1.5% (p/p)) y harina de colza (5-7.5 % (p/p)) (Francis *et al.*, 2001) podemos decir que el contenido de ácido fítico del frijol yorimón es relativamente bajo. Civera y Guillaume (1989) encontraron que para *L. vannamei* la inclusión de 1.09 % (p/p) de fósforo fítico en el alimento ocasiona una disminución en el

crecimiento y un aumento en el factor de conversión alimenticia. Tomando en cuenta que el aporte de fósforo fítico de la harina de frijol yorimón es de 0.15 % (p/p), no se considera un ingrediente rico en fósforo fítico, que pudiera tener efectos nocivos para el camarón.

Por efecto del tratamiento, el ácido fítico disminuyó significativamente por la germinación y la extrusión del frijol yorimón. El ácido fítico es la principal forma de almacenar fósforo de algunos granos, la disminución del contenido de ácido fítico durante la germinación es debido a que durante este proceso se produce la enzima fitasa, la cual hidroliza la molécula de ácido fítico hasta inositol y ortofosfatos, haciendo disponible el fósforo para ser utilizado en el proceso de crecimiento (Oberleas, 1983). Eskin y Wiebe (1983) encontraron que durante la germinación del haba común (*Vicia faba*) hay un rápido aumento de la actividad de fitasa y una marcada disminución del ácido fítico (77.3 %) después de 6 días de germinación. Ologhobo y Fetuga (1984) encontraron que después de germinar por 3 días el frijol yorimón, el ácido fítico disminuyó 47.9 %. En nuestro caso, se encontró una disminución del 34 %.

Por otro lado, se observó una disminución del ácido fítico de 24.5 % por el proceso de extrusión, esto se puede explicar debido a las condiciones extremas de temperatura y presión, ya que se ha visto que la molécula de ácido fítico es estable a altas temperaturas (Martínez *et al.*, 2002). Nelson y colaboradores (1980) reportaron que a 115 ° C por 30 minutos la remoción del ácido fítico en pasta de soya es del 21 %. Mientras que Satoh y colaboradores. (1988) encontraron que al extruir harina de canola a 150 ° C, el ácido fítico disminuyó en un 30 %.

### *Calorimetría diferencial de barrido*

Los termogramas de las harinas de frijol yorimón obtenidos por calorimetría diferencial de barrido, presentaron un primer pico, conocido como transición de gelatinización (Figura 9). El frijol yorimón sometido a los distintos tratamientos presentó una temperatura máxima de la primera transición (Tabla XI) con valores entre 81-82°C para frijol entero, decorticado y germinado.

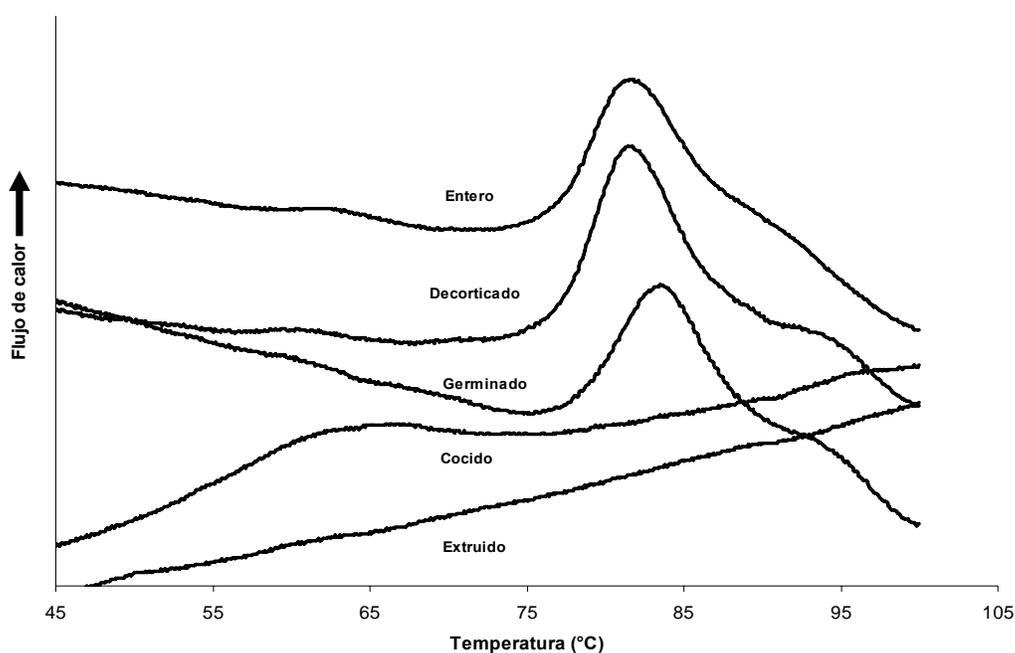


Figura 9. Termogramas de las harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.) obtenidas por diferentes procesos.

En el frijol yorimón cocido la temperatura del primer pico fue de 61.8 ° C y en el extruido no se detectó. Estas temperaturas de gelatinización no coinciden con las reportadas para otras leguminosas ya que para el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se ha determinado una temperatura de transición de 74.9 ° C y para lenteja (*Lens esculenta*) de 63.8 ° C. Se ha sugerido que las diferencias en las temperaturas de gelatinización de los almidones se deben a las diferencias en la forma y tamaño del gránulo del almidón, así como al contenido de amilasa y ordenamiento molecular interno (Yañez-Farías *et al.*, 1997).

El cambio de entalpía de la primera transición disminuyó significativamente con los tratamientos, siendo de 6.1 J/g para el frijol sin tratamiento; el cambio de esta energía fue de 4.3 J/g para el decorticado y 2.5 J/g para el germinado (Tabla XI). Estos valores de energía nos indican indirectamente que la cantidad de almidón nativo ha disminuido con la decorticación y con la germinación, ya que existe un menor número de enlaces intermoleculares en las cadenas de almidón para ser rotos.

En la decorticación, la velocidad de los discos abrasivos del decortificador aumenta la temperatura del sistema, provocando cambios en los componentes del grano, y en mayor grado a las estructuras cercanas a la cutícula del grano, principalmente los gránulos de almidón. En la germinación, las condiciones de humedad y temperatura favorecen la acción de las  $\alpha$ -amilasas presentes en el grano, mismas que actúan sobre el almidón (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

**Tabla XI. Entalpía y temperatura de la primera transición de harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*) obtenidas por diferentes procesos.**

<b>Ingrediente</b>	<b>Temperatura de transición (° C)<sup>1</sup></b>	<b>Entalpía de transición (J/g)<sup>1</sup></b>
Entero	81.59 <sup>b</sup> ±0.78	6.16 <sup>c</sup> ±0.64
Decorticado	81.42 <sup>b</sup> ±0.07	4.32 <sup>b</sup> ±0.20
Cocido	61.86 <sup>a</sup> ±1.59	1.42 <sup>a</sup> ±0.74
Germinado	82.95 <sup>b</sup> ±0.66	2.5 <sup>a</sup> ±0.65
Extruido	ND <sup>2</sup>	ND <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, <sup>2</sup> No detectado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

La primera transición detectada en el frijol cocido, cuyo valor de la temperatura es aproximadamente 20 °C menor que las muestras sin tratamiento térmico, puede interpretarse como la fusión del gel del almidón cristalizado (Biliaderis, 1992). Esto es, una vez que el almidón gelatinizado se enfría, se producen cambios en la estructura y las propiedades del gel, pasando a un estado cristalino. El cambio de entalpía de este proceso fue de 1.42 J/g. En el caso del frijol extruido no se detectó transición, ya que bajo las condiciones de temperatura y humedad usadas durante la extrusión, el almidón gelatinizó completamente.

El segundo pico que se detectó en las muestras de frijol germinado y decorticado, aparece inmediatamente después del pico I, unido a éste semejando un hombro y con temperaturas de 93.7 para el germinado y 95° C para el decorticado. Se sabe que la molécula de amilosa, bajo ciertas condiciones, se enrolla en forma de hélice y puede formar complejos de oclusión entre lípidos y carbohidratos. Se sabe también, que la aplicación de un gradiente de temperatura, ocasiona una modificación de la estructura de las moléculas del almidón que permite la formación de complejos de oclusión. Osman-Ismail (1972) encontró que la formación de los complejos de oclusión ocurre en un rango de temperatura de 23 a 85° C, y que la temperatura es función del tipo de almidón y del tipo de compuesto volátil, que puede ser un ácido graso libre. Por el aumento de la temperatura del sistema durante la decorticación, pudo ocurrir la formación de complejos de oclusión, que fueron detectados en el análisis térmico, por la energía que se necesitó para romperlos en las muestras de frijol decorticado. En arroz, se ha reportado que el rompimiento del complejo amilosa-ácido graso libre ocurre entre 91 y 95° C (Russell y Juliano, 1983).

### ***Digestibilidad in vitro***

La digestibilidad *in vitro* medida por el método AOAC (1990) de las harinas de frijol yorimón fue significativamente mayor para las harinas tratadas térmicamente por medio de cocción y extruido (88.7 y 85.6 % respectivamente). El decorticado también presentó una alta digestibilidad con pepsina (74.23 %) (Figura 10).

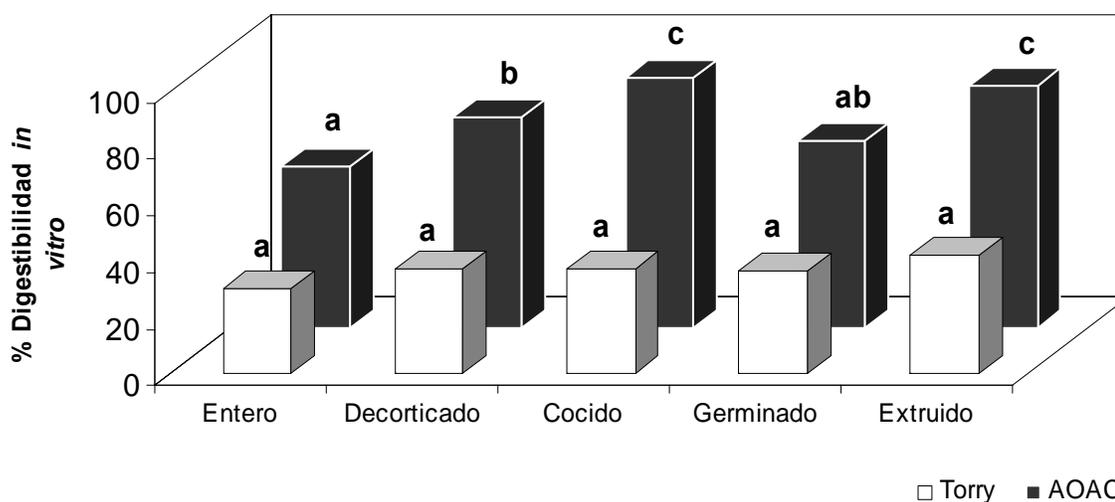


Figura 10. Digestibilidad *in vitro* de las diferentes harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

La digestibilidad *in vitro*, usando la modificación propuesta por el laboratorio Torry, no detectó diferencias entre los tratamientos. Posiblemente exista un efecto por la saturación de la pepsina por la proteína de las harinas de frijol, ya que la modificación del laboratorio Torry incluye el uso de una solución diluida de pepsina (1000 veces más diluida que AOAC), lo que ocasiona una modificación de la relación enzima:sustrato (Lehninger, 1995). Estos métodos de digestibilidad *in vitro* han demostrado ser sensibles para estimar la digestibilidad de harinas de pescado (Anderson *et al.* 1993, Nieto-López, 2003), encontrándose correlación significativa con la digestibilidad *in vivo* para camarón, principalmente el método de pepsina diluida propuesto por el laboratorio Torry. Es importante mencionar que estos métodos no han sido probados con ingredientes de origen

vegetal, los cuales tienen un contenido de proteína menor que la harina de pescado, además de las diferencias en el perfil de aminoácidos.

## **7.2. Digestibilidad *in vivo* de las harinas de frijol yorimón en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*.**

### ***Digestibilidad in vivo***

Las leguminosas constituyen una buena fuente de energía y proteína; sin embargo, la disponibilidad de estos nutrientes para organismos acuáticos es muy poco conocida (Davis *et al.*, 2002). Una de las desventajas del uso de ingredientes vegetales en acuicultura es que contienen factores antinutricionales tales como inhibidores de proteasas y amilasas, ácido fítico, hemaglutininas y taninos, entre otros, que ocasionan que los nutrientes sean menos disponibles para los organismos. Una alternativa para disminuir estos efectos es el de someter a los insumos vegetales a procesos que permitan su destrucción o inactivación.

Existen muy pocas publicaciones al respecto en camarón (Davis *et al.*, 2002; Cruz-Suárez *et al.*, 2001; Eusebio, 1991), trucha (Thiessen *et al.*, 2003; Cheng y Hardy, 2003), y carpa (Garg *et al.*, 2002).

Las condiciones de cultivo durante el bioensayo para determinar los coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDa) *in vivo* fueron de  $27.7 \pm 0.01$  ° C,  $39.7 \pm 0.00$  ups y  $4.4 \pm 0.01$  mg/mL de oxígeno disuelto, las cuales se mantuvieron constantes en todos los acuarios.

Los CUDa *in vivo* de materia seca, proteína, lípidos, fósforo, carbohidratos y energía de los alimentos experimentales elaborados con 15% de las diferentes harinas de frijol yorimón se muestran en la Tabla XII.

La digestibilidad aparente de materia seca de los alimentos varió de 68.05 a 75.34 %. Bajo las condiciones de este estudio, los procesos de extrusión, cocción, y germinado mejoraron significativamente la digestibilidad de la materia seca de los alimentos que contienen estas harinas con respecto al alimento control. Cruz-Suárez y colaboradores (2001) reportaron que la digestibilidad de materia seca de *Pisum sativum* extruido en alimentos para camarón aumentó significativamente y se le atribuye a la gelatinización de almidones ocasionado por el tratamiento térmico, ya que este ocasiona la pérdida del orden molecular de los gránulos de almidón y los hace mas susceptibles a la hidrólisis enzimática (Thiessen *et al.*, 2003).

Lo mismo sucedió aquí con la digestibilidad del alimento que contenía la harina de frijol cocido. Aunque en este trabajo no se determinó el grado de gelatinización de almidones, se puede relacionar con los resultados de calorimetría diferencial de barrido, donde se observó que las harinas sometidas a estos tres procesos, presentan una menor energía de transición, que se le atribuye a la gelatinización de los almidones.

Por otra parte, la cocción y extrusión aumentaron la digestibilidad aparente de la proteína en los alimentos que contenían estas harinas. Esto se puede atribuir a que el tratamiento térmico provocó la desnaturalización del inhibidor de tripsina, siendo más evidente en el proceso de extrusión. Otro efecto del tratamiento térmico es la desnaturalización parcial de

las proteínas, lo que las hace mas digeribles, en comparación con las proteínas nativas (Fennema, 1996).

**Tabla XII. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDa) *in vivo* (%  $\pm$  DE) de materia seca, proteína, carbohidratos, lípidos, fósforo y energía de los alimentos elaborados con harinas de frijol yorimón.**

Alimento	CUDa (%)					
	Materia seca	Proteína	Carbohidratos	Lípidos	Fósforo	Energía
Control	70.16 <sup>a</sup> $\pm 0.14$	85.81 <sup>ab</sup> $\pm 0.40$	77.71 <sup>a</sup> $\pm 0.56$	80.94 <sup>ab</sup> $\pm 2.62$	70.65 <sup>ab</sup> $\pm 0.42$	81.47 <sup>b</sup> $\pm 0.50$
Entero	71.11 <sup>ab</sup> $\pm 1.20$	85.88 <sup>ab</sup> $\pm 0.27$	76.70 <sup>a</sup> $\pm 1.0$	78.89 <sup>b</sup> $\pm 2.58$	69.33 <sup>b</sup> $\pm 1.26$	80.76 <sup>b</sup> $\pm 0.83$
Decorticado	68.05 <sup>a</sup> $\pm 0.15$	84.33 <sup>a</sup> $\pm 0.28$	81.28 <sup>b</sup> $\pm 1.06$	81.55 <sup>ab</sup> $\pm 2.76$	68.44 <sup>b</sup> $\pm 1.33$	82.66 <sup>ab</sup> $\pm 1.07$
Cocido	75.34 <sup>c</sup> $\pm 0.37$	88.26 <sup>c</sup> $\pm 0.25$	82.50 <sup>b</sup> $\pm 0.83$	84.30 <sup>ab</sup> $\pm 0.28$	73.58 <sup>a</sup> $\pm 1.31$	84.77 <sup>a</sup> $\pm 0.02$
Germinado	75.10 <sup>c</sup> $\pm 1.12$	87.19 <sup>bc</sup> $\pm 1.53$	81.15 <sup>b</sup> $\pm 0.69$	84.35 <sup>ab</sup> $\pm 0.83$	74.63 <sup>a</sup> $\pm 1.86$	84.68 <sup>a</sup> $\pm 0.27$
Extruido	74.20 <sup>bc</sup> $\pm 0.88$	87.87 <sup>c</sup> $\pm 0.44$	81.72 <sup>b</sup> $\pm 0.27$	85.01 <sup>a</sup> $\pm 2.12$	71.05 <sup>ab</sup> $\pm 2.01$	84.39 <sup>a</sup> $\pm 0.78$

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Varios estudios realizados con peneidos han reportado que no hay efecto significativo sobre la digestibilidad aparente de proteína debido al decorticado, pero sí por efecto de la extrusión de leguminosas (Eusebio, 1991; Cruz-Suárez *et al.*, 2001, Davis *et al.*, 2002).

A pesar de que no se encontró correlación ( $p > 0.05$ ) entre la digestibilidad *in vitro* (Figura 5) de las harinas y la digestibilidad *in vivo* de las dietas que las contienen, es importante resaltar que los resultados de digestibilidad aparente de proteína de los alimentos coinciden con la digestibilidad obtenida con pepsina de las harinas evaluadas. Así mismo, la actividad del inhibidor de tripsina en ingredientes fue significativamente menor para los tratamientos que involucran tratamiento térmico como lo son la cocción y extrusión. Por otro lado, aunque en los alimentos solo fue significativamente menor la actividad del inhibidor de tripsina en el alimento conteniendo frijol yorimón extruido, Ologhobo y Fetuga (1984) reportaron que la cocción del frijol yorimón ocasionó la completa remoción del inhibidor de tripsina y otros antinutrientes.

La digestibilidad aparente de los carbohidratos de los alimentos que contenían frijol yorimón decorticado, cocido, germinado y extruido aumentó significativamente con respecto al alimento con frijol entero crudo. Nnanna y Phillips (1990) reportaron que la germinación del frijol yorimón mejoró significativamente la digestibilidad del almidón en alimentos para ratas. Esto se le atribuye a la síntesis de enzimas amilolíticas durante la germinación con el fin de degradar el almidón y usarlo como fuente de energía para el desarrollo de la plántula. Además reportan que durante la germinación a 30 °C, los oligosacáridos (3.75 % (p/p) de materia seca) son degradados completamente, lo que debe contribuir al aumento de la digestibilidad de los carbohidratos. En el caso del frijol yorimón cocido y extruido es de esperarse que la digestibilidad de carbohidratos aumente, ya que como se discutió anteriormente, el tratamiento térmico gelatiniza los almidones, lo que permite una mejor digestión de los mismos.

La disponibilidad digestiva de fósforo de los alimentos, no se vió afectada con respecto a la del alimento control ( $p>0.05$ ).

La Tabla XIII muestra los coeficientes de utilización digestiva aparente de las harinas de frijol yorimón para *Litopenaeus vannamei*. La digestibilidad de materia seca del frijol yorimón entero fue de 76.5%, y aumentó significativamente por los procesos de cocción, germinado y extrusión.

**Tabla XIII. Coeficientes de utilización digestiva aparente (%  $\pm$  DE<sup>1</sup>) de materia seca, proteína cruda, carbohidratos, lípidos, fósforo y energía de las harinas de frijol yorimón (HFY) obtenidas por diferentes procesos, en alimentos para juveniles de *L. vannamei*.**

<b>Harina</b>	<b>Materia seca</b>	<b>Proteína</b>	<b>Carbohidratos</b>	<b>Lípidos</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Energía</b>
HYF Entero	76.46 <sup>ab</sup> ±8.05	86.33 <sup>b</sup> ±1.81	71.00 <sup>a</sup> ±6.68	77.19 <sup>a</sup> ±2.49	57.12 <sup>b</sup> ±2.55	76.72 <sup>a</sup> ±5.56
HFY Decorticado	56.13 <sup>a</sup> ±1.05	76.01 <sup>a</sup> ±1.87	101.57 <sup>b</sup> ±7.11	74.90 <sup>a</sup> ±7.77	60.95 <sup>b</sup> ±2.09	89.41 <sup>ab</sup> ±7.15
HFY Cocido	104.72 <sup>c</sup> ±2.51	102.18 <sup>c</sup> ±1.73	109.66 <sup>b</sup> ±5.59	103.35 <sup>b</sup> ±1.89	85.22 <sup>a</sup> ±1.45	103.46 <sup>b</sup> ±0.14
HFY Germinado	103.10 <sup>c</sup> ±7.50	100.70 <sup>c</sup> ±4.23	100.65 <sup>b</sup> ±4.63	103.68 <sup>b</sup> ±5.55	90.09 <sup>a</sup> ±2.54	102.86 <sup>b</sup> ±1.78
HFY Extruido	97.10 <sup>c</sup> ±5.93	99.54 <sup>c</sup> ±2.95	104.50 <sup>b</sup> ±1.81	116.15 <sup>b</sup> ±2.73	65.83 <sup>b</sup> ±4.45	100.96 <sup>b</sup> ±5.17

<sup>1</sup> Los valores son el promedio de tres réplicas  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0.05$ ).

Lo mismo sucedió con la digestibilidad de proteína y lípidos de las harinas, en tanto que la digestibilidad de carbohidratos aumentó por efecto del decortinado, cocido, germinado y extruido.

En nuestro estudio se encontró una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre la entalpía de la primera transición y la digestibilidad *in vivo* de las harinas de frijol yorimón sometidas a diferentes procesos, los cuales, afectaron principalmente la estructura nativa del almidón como se discutió previamente. En la Figura 11 se muestra esta correlación negativa, lo que nos indica que la energía necesaria para la primera transición es menor en aquellos ingredientes donde sus carbohidratos son mas digeribles.

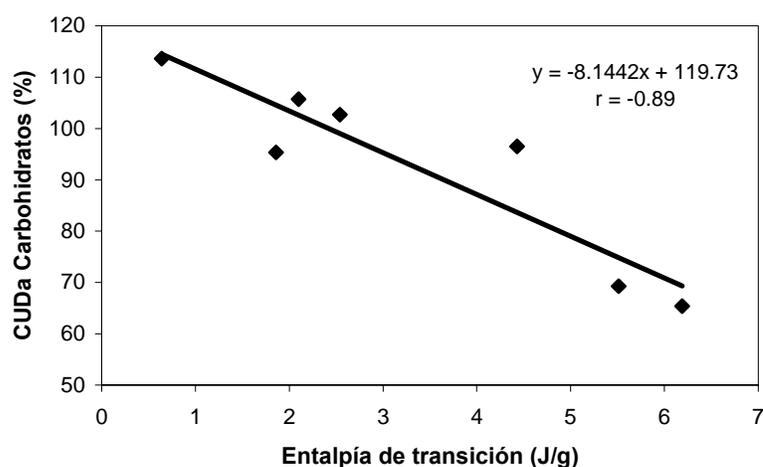


Figura 11. Relación entre el coeficiente de utilización digestiva aparente (CUDA) de carbohidratos y la entalpía de transición de las harinas de frijol yorimón obtenidas por diferentes procesos.

Estos resultados pueden proporcionar una base importante para considerar la calorimetría diferencial de barrido, como un método rápido y eficaz para predecir la digestibilidad de los carbohidratos de los ingredientes usados en la elaboración de alimentos para camarones. Otra de las ventajas de este método es que se evalúan las características térmicas de las muestras *in situ*, es decir, no es necesario someter a la muestra a una preparación previa que ocasione cambios en las estructuras de los nutrientes. Es importante mencionar que en este estudio se obtuvo una buena correlación al analizar datos obtenidos a partir de una misma leguminosa sometida a diferentes procesos tecnológicos, por lo que sería importante evaluar el método con diferentes fuentes de carbohidratos y probar así la sensibilidad de la calorimetría diferencial de barrido para predecir la digestibilidad *in vivo*.

Es importante hacer notar que los coeficientes de utilización digestiva aparente de las harinas de frijol yorimón decortinado, cocido, germinado y extruido en algunos casos fueron mayores al 100 %. Fisiológicamente esto no se puede explicar, pero este comportamiento se ha observado en camarón al determinar la digestibilidad de ingredientes vegetales (Brunson *et al.*, 1997, Divakaran *et al.*, 2000, Cruz-Suárez *et al.*, 2001).

Algunos autores atribuyen este comportamiento a una interacción entre los ingredientes que componen el alimento. Divakaran y colaboradores (2000) encontraron que posiblemente la cantidad de pasta de soya en el alimento (35 y 46.3 %) influye en la velocidad del paso del óxido de cromo por el tracto digestivo de *L. vannamei*, ya que encontraron una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre estos dos ingredientes. Brunson y colaboradores (1997) atribuyeron que los valores de 101, 110 y 107 % de digestibilidad de materia seca, proteína y energía del gluten de trigo para *P. setiferus*, se debe a la posible interacción entre los

nutrientes de los ingredientes. Una opción para evitar este efecto asociativo es usar alimentos que contengan solo el ingrediente de prueba, pero esto ocasionaría un desbalance de nutrientes.

Akiyama y colaboradores (1989) determinaron los coeficientes de utilización digestiva de trece ingredientes para *L. vannamei* utilizando el 88 % de inclusión de los ingredientes de prueba, además de aglutinantes, attractante y óxido de cromo como marcador. Estos investigadores encontraron coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca del gluten de trigo y pasta de soya de 85.4 y 84.1 % respectivamente, pero encontraron coeficientes de digestibilidad de materia seca de celulosa y quitina de -21.4 y -15.6 %, lo que nos indica que sí hay efecto por el desbalance de los alimentos utilizados en este estudio.

Otra posible causa de valores superiores al 100 % de digestibilidad puede ser la lixiviación de nutrientes de los alimentos y heces. Una estrategia adoptada por algunos investigadores (Brunson *et al.*, 1997, Cruz-Suarez *et al.*, 2001), es hacer una corrección con la lixiviación de nutrientes en el agua, pero aún así en ocasiones los valores son superiores al 100 %. En nuestro estudio, a pesar de contar con los datos de lixiviación de materia seca de los alimentos usados para estimar los coeficientes de utilización digestiva de las harinas de frijol yorimon, no se realizó esta corrección por considerar que a la fecha no se cuenta con un método para estimar la lixiviación de nutrientes en el agua de los alimentos que represente fidedignamente la lixiviación que es producida por la manipulación del alimento llevada a cabo por los camarones durante el proceso de alimentación.

La pérdida de nutrientes por la lixiviación de las heces se considera de poca importancia, ya que Fenucci y colaboradores (1982) reportaron que después de 6 horas de inmersión en el agua, no existió una lixiviación importante de óxido de cromo, proteínas y carbohidratos con *L. stylirostris*.

Se considera importante realizar estudios enfocados a identificar los factores que están influyendo en la estimación de los coeficientes de digestibilidad de los ingredientes vegetales en alimentos para camarón, para evitar su sobreestimación.

### ***Firmeza de los alimentos***

La firmeza, después de 30 minutos de remojo, de los alimentos usados en el bioensayo de digestibilidad, varió entre 1.08 y 2.84 J/g (Figura 12).

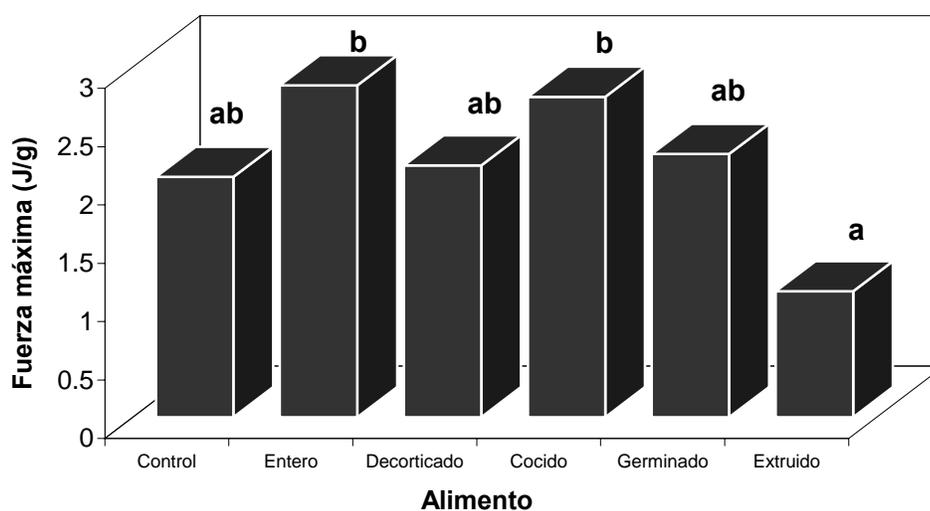


Figura 12. Firmeza de los alimentos con 15 % de inclusión de las harinas de frijol yorimón (*V. unguiculata*) elaboradas por diferentes procesos usados en el ensayo de digestibilidad *in vivo* para *L. vannamei*.

Se encontró que el alimento con 15 % de harina de frijol yorimón extruido es significativamente más blando que los alimentos conteniendo frijol yorimón entero y cocido, pero no con respecto al alimento control o con los alimentos con frijol decortinado o germinado.

A pesar de que la textura del alimento para camarones peneidos es un factor muy importante para su consumo (Cruz-Suárez *et al.*, 1996), existe muy poca información acerca de esta característica. Cerecer-Cota y colaboradores (2004) reportaron que la firmeza del alimento se correlaciona negativamente con el consumo del alimento ( $p < 0.05$ ) por *L. vannamei*, es decir se observó un mayor consumo del alimento con menor firmeza. En el presente estudio no se encontró correlación significativa entre la firmeza y la digestibilidad *in vivo* de los alimentos para *L. vannamei*, por lo que se considera que las diferencias en la firmeza de los alimentos usados en el bioensayo no afectaron significativamente la digestibilidad de los mismos.

***Efecto de la inclusión de las diferentes harinas de frijol yorimón en el alimento sobre la actividad enzimática de la glándula digestiva del camarón blanco del Pacífico.***

La Tabla XIV muestra la actividad enzimática digestiva de los organismos alimentados con alimentos que contienen diferentes harinas de frijol yorimón, y donde se observa que la actividad tipo tripsina aumentó significativamente por la inclusión del frijol yorimón en los alimentos, independientemente del tratamiento. Existen reportes que indican que la actividad enzimática digestiva se ve modificada por efecto del ayuno, edad, calidad y cantidad de proteína en el alimento (Maugle *et al.*, 1982; Le Moullac *et al.*, 1994;

Rodríguez *et al.*, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996; Ezquerra *et al.*, 1997, Ezquerra *et al.*, 1999). El incremento en la actividad de tripsina al usar ingredientes vegetales se ha atribuido al contenido del inhibidor de tripsina de estos insumos, ya que ocasiona una sobreproducción de esta enzima (Fennema, 1996). Sin embargo, bajo las condiciones de este estudio, no se encontró una correlación significativa entre la actividad tipo tripsina en la glándula digestiva de camarón blanco y la actividad del inhibidor de tripsina en los alimentos.

**Tabla XIV. Actividad enzimática del extracto crudo de la glándula digestiva de camarón blanco (*Litopennaeus vannamei*) alimentado con las diferentes harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*).**

Alimento	Proteína soluble (mg/ml)	Proteasas totales (U <sup>1</sup> /mg Prot.)	Tripsina (U <sup>2</sup> /mg Prot.)	Quimotripsina (U <sup>3</sup> /mg Prot.)	Amilasa (U <sup>4</sup> /mg Prot.)	Lipasa (U <sup>5</sup> /mg Prot.)
Control	1.42 <sup>a</sup> ±0.11	2.11 <sup>a</sup> ±0.49	0.33 <sup>a</sup> ±0.09	0.027 <sup>c</sup> ±0.003	32.31 <sup>a</sup> ±4.54	7.13 <sup>a</sup> ±2.13
Entero	1.36 <sup>a</sup> ±0.05	1.63 <sup>a</sup> ±0.39	0.41 <sup>b</sup> ±0.02	0.009 <sup>ab</sup> ±0.001	34.87 <sup>a</sup> ±2.23	5.90 <sup>a</sup> ±0.89
Decorticado	1.35 <sup>a</sup> ±0.06	2.31 <sup>a</sup> ±0.43	0.41 <sup>b</sup> ±0.02	0.012 <sup>b</sup> ±0.005	29.20 <sup>a</sup> ±5.78	6.02 <sup>a</sup> ±2.55
Cocido	1.29 <sup>a</sup> ±0.06	2.16 <sup>a</sup> ±0.26	0.41 <sup>b</sup> ±0.03	0.005 <sup>a</sup> ±0.002	29.31 <sup>a</sup> ±8.02	4.99 <sup>a</sup> ±1.66
Germinado	1.33 <sup>a</sup> ±0.10	1.64 <sup>a</sup> ±0.37	0.42 <sup>b</sup> ±0.03	0.006 <sup>a</sup> ±0.001	33.31 <sup>a</sup> ±6.66	6.81 <sup>a</sup> ±1.50
Extruido	1.33 <sup>a</sup> ±0.08	1.70 <sup>a</sup> ±0.40	0.42 <sup>b</sup> ±0.02	0.006 <sup>a</sup> ±0.000	25.88 <sup>a</sup> ±5.66	4.70 <sup>a</sup> ±2.07

<sup>1</sup> Unidades=ΔAbs<sub>440</sub>/minuto; azocaseína como sustrato, 37 ° C;

<sup>2</sup> Unidades=(ΔAbs<sub>410</sub>/minuto)(1.51\*1000)/8800, BAPNA como sustrato, 37°C;

<sup>3</sup> Unidades=(ΔAbs<sub>410</sub>/minuto)(0.51\*1000)/8800; SAPNA como sustrato, 37°C;

<sup>4</sup> Unidades=ΔAbs<sub>550</sub>/minuto; almidón como sustrato, 37 ° C;

<sup>5</sup> Unidades=ΔAbs<sub>540</sub>/min; β-Naftil caprilato como sustrato, 37 ° C;

Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, la actividad enzimática tipo quimotripsina disminuyó por efecto de la inclusión del frijol yorimón en el alimento. Esto coincide con algunos estudios que han reportado que la actividad de quimotripsina en *Litopenaeus vannamei* no se ve afectada por el nivel de proteína en el alimento, pero sí por la fuente de proteína (Le Moullac *et al.*, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996).

### **7.3. Uso del frijol yorimón (*Vigna unguiculata L. Walp.*) como ingrediente en alimentos para juveniles del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*.**

La soya es la leguminosa que más se usa en la alimentación de peces y camarones. Debido a la alta demanda que se ha generado de la soya, se han buscado ingredientes alternos para su inclusión en estos alimentos (Olvera-Novoa y Olivera-Castillo, 2000). En este ensayo se usaron diferentes niveles de inclusión de la harina de frijol yorimón, sustituyendo en 0, 25, 50, 75 y 100 % en peso a la pasta de soya y la harina de trigo. Para lograr estos niveles de sustitución, en el alimento control se incluyó a la pasta de soya y la harina de trigo en una relación del 1:2, ya que esta mezcla de ingredientes tiene una composición proximal muy similar a la de la harina de frijol yorimón entero (26 % proteína, 1 % lípidos, 3.9 % cenizas, 2.6 % fibra y 66 % (p/p) ELN en base seca).

La estabilidad en el agua de los alimentos usados en este ensayo, expresada como porcentaje de materia seca retenida, tiende a disminuir con la inclusión de la harina de frijol yorimón entero, se encontró una correlación negativa ( $r=-0.78$ ), pero solo fue significativamente menor ( $p<0.05$ ) con el 60 % de inclusión, disminuyendo hasta 89.9 %

(Tabla XV). Se ha observado este efecto al incluir ingredientes vegetales en alimentos para camarón (Lim y Dominy, 1990; Cruz-Suárez *et al.*, 2001).

**Tabla XV. Estabilidad en el agua (% de materia seca retenida) al cabo de 60 minutos de inmersión, de los alimentos con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón entero.**

<b>Alimento</b>	<b>% Materia seca retenida</b>
Control	95.7 <sup>a</sup> ±1.5
FYE15 %	94.7 <sup>a</sup> ±1.2
FYE 30%	93.6 <sup>a</sup> ±1.9
FYE 45 %	93.3 <sup>a</sup> ±0.9
FYE 60%	89.9 <sup>b</sup> ±1.9

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Ávalos-Zubieta (2001) no encontró diferencias en la estabilidad de los alimentos al incluir hasta un 60 % de *Phaseolus vulgaris* en alimentos para camarón. Considerando que la gelatinización del almidón juega un papel importante en la estabilidad de los alimentos, ya que actúa como aglutinante (Obaldo *et al.*, 1995, Obaldo *et al.*, 2000, Bortone, 2005), los resultados obtenidos en nuestro estudio se pueden explicar en base a las propiedades funcionales de los almidones de los ingredientes, ya que al incluir la harina de frijol

yorimón en un 60 %, la pasta de soya y la harina de trigo fueron sustituidas al 100%, por lo que probablemente, el almidón del frijol yorimón entero tiene menor funcionalidad que el almidón de estos ingredientes. Schoch y Maywald (1968) atribuyen las diferencias en las propiedades funcionales del almidón de varias leguminosas a la forma y tamaño de los gránulos de almidón, al tipo y grado de cristanilidad de los almidones y a la carga iónica de los mismos.

En la Tabla XVI, se muestran los resultados zootécnicos y de utilización del alimento obtenidos en el ensayo de crecimiento, donde se evaluaron alimentos que incluían harina de frijol yorimón entero (15, 30, 45 y 60 %), como sustituto de la pasta de soya y la harina de trigo.

La supervivencia de los camarones no se vió afectada por la inclusión de la harina de frijol yorimón entero, siendo superior al 95 % con todos los tratamientos. En general, se ha visto que el uso de ingredientes vegetales en alimentos para *L. vannamei*, no afectan de manera significativa la supervivencia (Lim y Dominy, 1990, Lim *et al.*, 1997, Davis y Arnold, 2000, Ávalos, 2001, Davis *et al.*, 2002).

Eusebio (1991) reportó supervivencias bajas (32-52%) de *P. monodon* al usar el frijol yorimón al 30 %, pero esta respuesta no se atribuye a la inclusión del frijol yorimón, ya que no se encontró diferencia con respecto al alimento control. Esta respuesta fue atribuida por el autor a un posible desbalance de aminoácidos o al estrés de los organismos.

**Tabla XVI. Resultados zootécnicos y de utilización del alimento del bioensayo de crecimiento para evaluar la inclusión de la harina de frijol yorimón entero como sustituto de soya y trigo en el alimento para *L. vannamei*.**

Alimento	Peso Inicial (g)	Supervivencia (%)	Peso final (g)	Incremento en peso corregido (g/org/día)	Alimento consumido (g/org/día)	Factor de conversión alimenticia	Eficiencia proteica
<b>Control</b>	0.77 <sup>a</sup> ±0.02	95 <sup>a</sup> ±5	5.02 <sup>ab</sup> ±0.39	0.09 <sup>ab</sup> ±0.01	0.16 <sup>ab</sup> ±0.02	1.76 <sup>b</sup> ±0.11	1.63 <sup>a</sup> ±0.11
<b>FYE15 %</b>	0.79 <sup>a</sup> ±0.02	95 <sup>a</sup> ±5	4.82 <sup>ab</sup> ±0.54	0.08 <sup>ab</sup> ±0.01	0.19 <sup>ab</sup> ±0.03	2.04 <sup>ab</sup> ±0.15	1.40 <sup>a</sup> ±0.10
<b>FYE 30%</b>	0.79 <sup>a</sup> ±0.01	95 <sup>a</sup> ±5	4.52 <sup>ab</sup> ±0.19	0.08 <sup>ab</sup> ±0.00	0.16 <sup>ab</sup> ±0.02	1.98 <sup>ab</sup> ±0.14	1.45 <sup>a</sup> ±0.10
<b>FYE 45 %</b>	0.77 <sup>a</sup> ±0.01	100 <sup>a</sup> ±0	3.97 <sup>b</sup> ±0.29	0.07 <sup>b</sup> ±0.01	0.14 <sup>b</sup> ±0.01	1.97 <sup>ab</sup> ±0.03	1.45 <sup>a</sup> ±0.02
<b>FYE 60%</b>	0.79 <sup>a</sup> ±0.01	98 <sup>a</sup> ±4	5.57 <sup>a</sup> ±0.41	0.11 <sup>a</sup> ±0.02	0.25 <sup>a</sup> ±0.02	2.40 <sup>a</sup> ±0.22	1.20 <sup>b</sup> ±0.11

Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La Figura 13 muestra las curvas de crecimiento de los organismos durante los 45 días del ensayo de crecimiento. Los alimentos fueron formulados para cubrir los requerimientos de aminoácidos de acuerdo a Akiyama y colaboradores (1992) (Tabla XVII).

Probablemente, al no presentar deficiencia en el contenido de aminoácidos esenciales, el crecimiento de los organismos alimentados con los alimentos que contenían frijol yorimón no se vió afectado significativamente con respecto al alimento control.

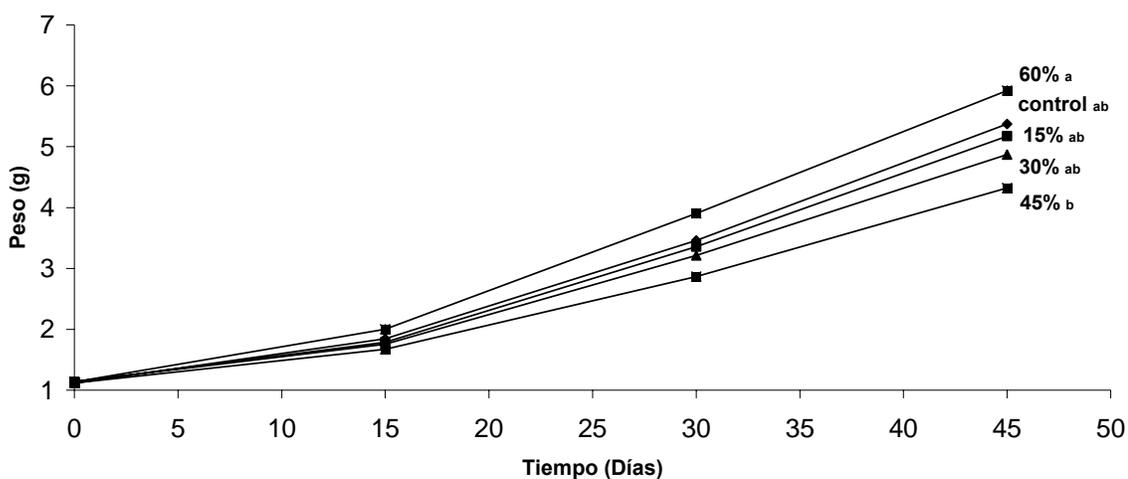


Figura 13. Curvas de crecimiento de juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero (*Vigna unguiculata L. Walp.*) durante 45 días.

Aunque el frijol yorimón no había sido evaluado como ingrediente en alimentos para *L. vannamei*, sí se han usado otras leguminosas como el frijol común (Ávalos, 2001) y el chícharo (*Pisum sativum*) (Davis *et al.*, 2002), encontrando que con 60 y 20 % (p/p) de inclusión, respectivamente, el crecimiento no se ve afectado. De igual manera, Eusebio (1991) incluyó la harina de frijol yorimón entero al 30 % (p/p) en alimentos para *Penaeus monodon*, sustituyendo 100 % (p/p) la pasta de soya y otros ingredientes vegetales, y no observó un efecto significativo en el crecimiento. Estos estudios apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo, que indica que la harina de frijol yorimón, no produjo efectos negativos en el crecimiento de *L. vannamei*.

**Tabla XVII. Composición proximal y de aminoácidos<sup>1</sup> (g/100 g de alimento) de los alimentos para *Litopenaeus vannamei* con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón en sustitución de pasta de soya y harina de trigo.**

Nutriente	Alimento				
	Control	15 %	30 %	45 %	60 %
Humedad	5.51	5.53	5.06	5.28	4.97
	±0.16	±0.31	±0.07	±0.14	±0.16
Proteína cruda	35.59	35.45	34.91	34.90	35.16
	±0.01	±0.23	±0.21	±0.05	±0.22
Extracto etéreo	7.80	7.31	7.32	6.92	6.89
	±0.26	±0.16	±0.07	±0.16	±0.28
Cenizas	8.54	8.61	8.75	8.82	8.88
	±0.02	±0.03	±0.04	±0.03	±0.03
Fibra cruda	0.58	0.96	0.71	0.64	0.64
	±0.00	±0.00	±0.00	±0.00	±0.00
ELN	47.49	47.67	48.31	52.88	52.58
Energía (kJ/g) <sup>2</sup>	18.68	18.79	18.86	18.84	18.97
	±0.02	±0.02	±0.02	±0.02	±0.02
Arginina	1.98	1.97	1.97	1.96	1.95
Fenilalanina	1.48	1.48	1.48	1.49	1.49
Histidina	0.92	0.96	0.99	1.03	1.06
Isoleucina	1.63	1.60	1.57	1.54	1.51
Leucina	2.45	2.44	2.42	2.41	2.40
Lisina	2.46	2.52	2.59	2.65	2.71
Metionina	0.81	0.80	0.78	0.77	0.76
Treonina	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36
Triptófano	0.36	0.36	0.35	0.34	0.34
Valina	2.23	2.11	2.00	1.89	1.78

<sup>1</sup> Composición de aminoácidos de los ingredientes obtenida de Murillo-Amador *et al.*, 2000 y Tacon, 1989;

<sup>2</sup> Determinada como se describió en la sección 6.2.2.

El consumo del alimento no se vió afectado significativamente, por lo que aparentemente el frijol yorimón no afecta de manera significativa la palatabilidad del alimento, probablemente se debe a que en este estudio se sustiruyeron ingredientes vegetales, y no la harina de pescado, por lo que el 28 % de harina de pescado que contienen los alimentos es suficiente para que sea atractivo y palatable para los organismos. Lim y Dominy (1990) sustituyeron las harinas de origen animal con pasta de soya hasta en 100 % (p/p), encontrando que sustituyéndola por arriba del 60 % (p/p), el consumo del alimento disminuye significativamente, lo que se le atribuye un efecto negativo sobre la palatabilidad del alimento.

El factor de conversión alimenticia aumentó significativamente en el alimento con 60 % (p/p) de frijol yorimón, esto se puede relacionar con la estabilidad en el agua de este alimento, ya que, como se mencionó anteriormente, al aumentar el nivel de inclusión, disminuyó el porcentaje de materia seca retenida, por lo que el consumo de este alimento puede estar sobreestimado.

La eficiencia proteica disminuyó significativamente en el alimento con un 60 % (p/p) de inclusión de la harina de frijol yorimón, lo que indica que la proteína del alimento no fue lo mas eficientemente convertida a tejido, como sucedió con el resto de los tratamientos. Este efecto puede ser explicado también, en base a la estabilidad del alimento en el agua, ya que el alimento con 60 % (p/p) de inclusión de harina de frijol yorimón es menos estable, como ya se discutió previamente.

Hay una gran cantidad de estudios donde se ha visto que la actividad enzimática digestiva de peneidos se modifica por efecto de la edad, peso, calidad y cantidad de los nutrientes y presencia de inhibidores (Maugle *et al.*, 1982; Rodríguez *et al.*, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996; Ezquerra *et al.*, 1997, Ezquerra *et al.*, 1999, Lemos *et al.*, 2000). A pesar de que no se ha encontrado una correlación significativa entre el crecimiento y la actividad enzimática digestiva, se considera un indicador importante del estado fisiológico de los organismos (Brito *et al.*, 2001).

La proteína soluble y la actividad enzimática digestiva del tipo tripsina y lipasa en el hepatopáncreas no se vieron afectadas por el nivel de inclusión de la harina de frijol yorimón (Tabla XVIII). Las proteasas alcalinas totales disminuyeron significativamente con la inclusión de la harina de frijol yorimón, sucediendo lo contrario con la actividad de quimotripsina, la cual se vió incrementada por efecto de la inclusión. A pesar de que los mecanismos de regulación de la actividad enzimática para peneidos no son bien conocidos a la fecha, sí se sabe que la inclusión de ingredientes de origen vegetal, ocasionan una vacuolización de las células B en la glándula digestiva, ocasionada por una mayor producción de enzimas digestivas.

Se encontró diferencia significativa en la actividad de amilasa entre los tratamientos, aunque no se encontró un patrón con la inclusión de la harina de frijol yorimón, como en el caso de la actividad de proteasas totales y quimotripsina.

**Tabla XVIII. Actividad enzimática digestiva de *L. vannamei* alimentado por 45 días con dietas conteniendo diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero (*Vigna unguiculata*).**

Alimento	Proteína soluble (mg/ml)	Proteasas totales ( <sup>1</sup> U/mg proteína)	Tripsina ( <sup>2</sup> U/mg proteína)	Quimotripsina ( <sup>3</sup> U/mg proteína)	Amilasa ( <sup>4</sup> U/mg proteína)	Lipasa ( <sup>5</sup> U/mg proteína)
Control	20.7 <sup>a</sup> ±1.3	0.19 <sup>a</sup> ±0.008	0.027 <sup>a</sup> ±0.0012	0.003 <sup>c</sup> ±0.0003	1.043 <sup>bc</sup> ±0.009	0.24 <sup>a</sup> ±0.06
FYE15 %	20.3 <sup>a</sup> ±0.4	0.15 <sup>b</sup> ±0.008	0.028 <sup>a</sup> ±0.0001	0.005 <sup>a</sup> ±0.0003	1.060 <sup>ab</sup> ±0.009	0.21 <sup>a</sup> ±0.05
FYE 30%	20.5 <sup>a</sup> ±2.0	0.16 <sup>b</sup> ±0.009	0.027 <sup>a</sup> ±0.0002	0.005 <sup>a</sup> ±0.0004	1.033 <sup>c</sup> ±0.010	0.26 <sup>a</sup> ±0.04
FYE 45 %	20.1 <sup>a</sup> ±1.0	0.16 <sup>b</sup> ±0.004	0.030 <sup>a</sup> ±0.0028	0.004 <sup>ab</sup> ±0.0004	1.041 <sup>bc</sup> ±0.016	0.31 <sup>a</sup> ±0.05
FYE 60%	19.5 <sup>a</sup> ±1.7	0.16 <sup>b</sup> ±0.012	0.029 <sup>a</sup> ±0.0006	0.004 <sup>bc</sup> ±0.0002	1.071 <sup>a</sup> ±0.002	0.25 <sup>a</sup> ±0.05

<sup>1</sup> Unidades= $\Delta\text{Abs}_{440}/\text{minuto}$ ; azocaseína como sustrato, 37 ° C;

<sup>2</sup> Unidades= $(\Delta\text{Abs}_{410}/\text{minuto})(1.51*1000)/8800$ , BAPNA como sustrato, 37°C;

<sup>3</sup> Unidades= $(\Delta\text{Abs}_{410}/\text{minuto})(0.51*1000)/8800$ ; SAPNA como sustrato, 37°C;

<sup>4</sup> Unidades= $\Delta\text{Abs}_{550}/\text{minuto}$ ; almidón como sustrato, 37 ° C;

<sup>5</sup> Unidades= $\Delta\text{Abs}_{540}/\text{min}$ ;  $\beta$ -Naftil caprilato como sustrato, 37 ° C;

Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

Se evaluó el efecto del nivel de inclusión de la harina de frijol yorimón en el contenido de proteína, lípidos y energía del músculo del camarón blanco *L. vannamei* (Tabla XIX). El contenido de proteína cruda fue ligeramente menor cuando el nivel de inclusión fue de 15 y 60 %.

**Tabla XIX. Composición en proteína, extracto etéreo y energía del músculo de *L. vannamei* alimentado con diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero (*Vigna unguiculata*).**

<b>Alimento</b>	<b>Proteína cruda (% en base seca)</b>	<b>Extracto etéreo (% en base seca)</b>	<b>Energía (KCal/g)</b>
Control	81.57 <sup>a</sup> ±0.30	1.93 <sup>b</sup> ±0.10	5192 <sup>a</sup> ±11.23
FYE 15 %	79.33 <sup>b</sup> ±0.15	1.95 <sup>b</sup> ±0.15	4774 <sup>b</sup> ±6.59
FYE 30%	81.40 <sup>a</sup> ±0.22	1.79 <sup>b</sup> ±0.21	4738 <sup>b</sup> ±27.56
FYE 45%	81.49 <sup>a</sup> ±0.21	2.49 <sup>a</sup> ±0.13	4764 <sup>b</sup> ±8.47
FYE 60%	79.75 <sup>b</sup> ±0.05	1.96 <sup>b</sup> ±0.13	4759 <sup>b</sup> ±9.02

Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Olvera-Novoa y colaboradores (1997) usaron un concentrado protéico de frijol yorimón en alimentos para tilapia, encontrando una mayor deposición de proteína en el músculo a medida que el concentrado protéico de frijol yorimón aumentaba, indicando que una mayor proporción de la proteína del alimento es destinada para el crecimiento y no como energía, en el presente trabajo no se observó esta tendencia.

El contenido de lípidos aumentó significativamente cuando la inclusión de la harina de frijol yorimón fue de 45 %. La energía del músculo disminuyó significativamente con todos los niveles de inclusión de la harina de frijol yorimón.

El balance energético es una herramienta útil para determinar la capacidad de los organismos para utilizar la energía ingerida en tejido corporal, después de haber pagado los costos metabólicos necesarios para mantenerse vivos (Rosas *et al.*, 2003).

El consumo de oxígeno es una respuesta muy sensible a los cambios medioambientales, como temperatura y salinidad (Ocampo 1998, Rosas *et al.*, 2003, Re *et al.*, 2004), por otro lado se ha evaluado el efecto en el consumo de oxígeno de diferentes niveles de proteínas, carbohidratos y de hidrolizado de langostilla como aditivo en alimentos para camarón (Rosas *et al.*, 1996, Rosas *et al.*, 2002, Galicia, 2003), sin embargo no se ha evaluado el efecto de la inclusión de ingredientes vegetales en alimentos para juveniles de *L. vannamei*.

Se determinó el consumo de oxígeno o tasa respiratoria de rutina, que se define como la suma de la energía mínima para que un organismo se mantenga vivo (basal) y la energía necesaria para realizar las funciones diarias en ausencia de alimento (Rosas *et al.*, 2003). Como lo muestra la Tabla XX, los camarones con 24 h de ayuno, presentaron un metabolismo de rutina entre 0.0040 y 0.0051 mg O<sub>2</sub>/g/min, estos valores se encuentran dentro de los intervalos de consumo de oxígeno de rutina reportados para algunos camarones peneidos (Galicia, 2003, Ocampo, 1994).

El consumo de oxígeno de rutina de los organismos alimentados con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón, no se vió afectado significativamente, a pesar de estar aclimatados al alimento experimental por 45 días.

Rosas y colaboradores (2002) encontraron que juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 30 días con alimentos que contenían 0 y 30 % (p/p) de carbohidratos y 47.7 y 14.7

% (p/p) de proteína, respectivamente, presentaron un metabolismo respiratorio de rutina significativamente diferente, debido probablemente a que los organismos adoptaron estrategias diferentes para el metabolismo de los alimentos.

**Tabla XX. Consumo de oxígeno post-alimentario, Incremento en calor aparente y pérdida de energía en juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón *V. unguiculata*.**

Alimento	Metabolismo de rutina (mgO <sub>2</sub> /g/h)	Metabolismo post-alimentario (mgO <sub>2</sub> /g/h)	Incremento En el consumo de oxígeno (%)	<sup>1</sup> Incremento en calor aparente (ICA) (J/h)	Tiempo necesario para alcanzar el pico máximo (h)	<sup>2</sup> Pérdida de energía como calor (J)
Control	0.294 <sup>a</sup> ±0.078	1.10 <sup>a</sup> ±0.30	213.5	11.27	1.5 <sup>b</sup> ±0.3	16.91
15%	0.276 <sup>a</sup> ±0.054	1.08 <sup>a</sup> ±0.18	291.3	11.36	1.7 <sup>b</sup> ±0.4	19.31
30 %	0.306 <sup>a</sup> ±0.060	1.00 <sup>ab</sup> ±0.12	225.5	9.75	2.8 <sup>a</sup> ±0.4	27.29
45 %	0.240 <sup>a</sup> ±0.042	0.89 <sup>b</sup> ±0.18	270.0	8.56	2.7 <sup>a</sup> ±0.7	23.11
60 %	0.288 <sup>a</sup> ±0.042	0.80 <sup>b</sup> ±0.12	179.2	7.29	1.6 <sup>b</sup> ±0.3	11.66

<sup>1</sup> (Metabolismo post-alimentario – Metabolismo de rutina)\*Valor energético de 14.125 J/mg para *Farfantepenaeus californiensis* (Villareal *et al.*, 2003). <sup>2</sup>ICA\*Tiempo necesario para alcanzar el pico máximo

En nuestro estudio la composición en nutrientes de los alimentos es muy similar, por lo que probablemente los organismos no presentaron una adaptación al alimento, lo que se vió reflejado en un metabolismo de rutina sin diferencia significativa.

El consumo de oxígeno post-alimentario disminuyó a medida que aumentó la inclusión de la harina de frijol yorimón en el alimento, siendo significativamente menor en los

organismos alimentados con 45 y 60 % de harina de frijol yorimón, con respecto al alimento control. El tiempo necesario para alcanzar el pico máximo de consumo de oxígeno post-alimentario fue significativamente menor para los organismos alimentados con el alimento control, 15 y 60 % de inclusión de frijol yorimón, lo que indica que el tiempo en digerir el alimento es menor, y teóricamente podría llevar a cabo mas ingestas al día, pero esto no se vió reflejado en el consumo de alimento (Tabla XVI), ya que no se encontró diferencia significativa en el consumo de los alimentos con respecto al alimento control, en el experimento de crecimiento.

Rosas (2000) reportó que al aumentar los niveles de proteína en el alimento de *P. setiferus*, aumenta el tiempo necesario para alcanzar el pico máximo de consumo de oxígeno, por lo que este comportamiento se ha relacionado con las características nutricionales del alimento. Galicia (2003) encontró que juveniles de *L. vannamei* alimentados con 9 % de hidrolizado de langostilla presentaron una tasa metabólica máxima después de una hora y presentaron un mayor crecimiento con respecto a los organismos alimentados sin hidrolizado de langostilla que alcanzaron su tasa máxima después de 2 horas de alimentarse.

El incremento en el calor aparente (ICA) se define como la cantidad de energía invertida en las transformaciones mecánicas y bioquímicas del alimento durante la ingestión y digestión, y se calcula a partir de la diferencia entre la tasa metabólica post-alimentaria y la de rutina (Rosas *et al.*, 2003).

Los cambios en el ICA se han visto que son ocasionados por las características nutricionales de los alimentos, como contenido proteico (Rosas *et al.*, 2003), uso de aditivos (Galicia, 2003, Gallardo *et al.*, 2004) y factores ambientales (Rosas *et al.*, 1998, Ocampo, 1998). En el presente trabajo estas condiciones se mantuvieron constantes en los diferentes tratamientos, ya que son alimentos isoproteicos e isocalóricos.

Para los organismos alimentados con el alimento control se estimó un ICA de 11.27 y disminuyó a medida que aumentó la inclusión de la harina de frijol yorimón en el alimento hasta 7.29 J/h en los organismos alimentados con 60 % de harina de frijol yorimón, lo que indica que los camarones alimentados con 60 % de este ingrediente “gastan” menos energía durante los procesos de ingesta y digestión del mismo, por lo que pueden destinar mayor energía para la formación de biomasa, a pesar de que el crecimiento de estos organismos no fue significativamente mayor con respecto al alimento control, si presentaron una tendencia a crecer mas.

El ICA representa entre el 1 y 2 % de la energía ingerida en los alimentos con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón, este porcentaje indica que los camarones usados en este ensayo invierten poca energía para la digestión y metabolismo de los alimentos, ya que se ha reportado que para peces y camarones peneidos el ICA representa entre 5 y 20 % de la energía ingerida en el alimento (Beamish y Tripple, 1990, Rosas *et al.*, 1996).

En los crustáceos decápodos la excreción de amonio representa más del 85 % de la excreción nitrogenada (Regnault, 1987). La excreción de amonio en camarones se ve afectada por factores tales como temperatura, salinidad, calidad y cantidad de proteína en el

alimento (Ocampo 1998, Galicia 2003, Rosas *et al.*, 2003, Re *et al.*, 2004). La excreción de amonio de rutina de los camarones, no se vió afectada por el nivel de inclusión de la harina de frijol yorimón con respecto al alimento control, y se encontró entre 0.0005 y 0.0010  $\mu\text{m/g/min}$ . (Figura 14).

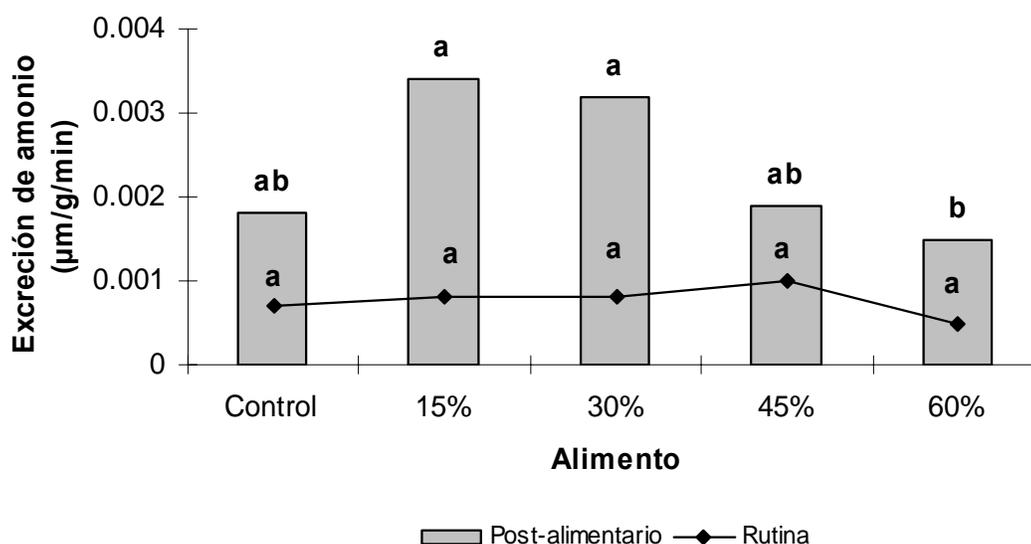


Figura 14. Excreción de amonio de juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero (*Vigna unguiculata*).

En el presente trabajo no se encontró diferencia significativa en la excreción de amonio post-alimentario con respecto al alimento control, y varió entre 0.0015 y 0.0034  $\mu\text{m/g/min}$ . El incremento en la excreción de amonio post-alimentario de camarones se ha relacionado con la mayor desaminación de los aminoácidos del alimento, ocasionada por un desbalance de aminoácidos esenciales, o bien por un exceso en el aporte de proteína o energía por el

alimento (Rosas, 2000). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se explican considerando que los alimentos usados en el presente experimento son isoprotéicos, isocalóricos y cubren los requerimientos de aminoácidos esenciales, como se mencionó anteriormente.

La relación O:N fue baja para todos los tratamientos (Tabla XXI), varió de 0.31 a 0.60. Niveles bajos de la relación O:N, como en nuestro caso, indican altas tasas de excreción de amonio, debido a un mayor catabolismo de proteínas para la obtención de energía. De acuerdo a Mayzaud y Conover (1988) un valor de la relación O:N entre 3 y 8 indica que el catabolismo de proteínas es usado como principal fuente de energía, a medida que este valor aumenta, disminuye el uso de proteínas aumenando el metabolismo de carbohidratos y lípidos hasta que valores entre 50 y 60 indican un equilibrio (50 % proteínas-50 % carbohidratos y lípidos). Valores mayores a 100 indican que los organismos usan carbohidratos y lípidos como fuente de energía metabólica en lugar de las proteínas.

Galicia (2003) reporta una relación O:N entre 1.6 y 8.03 para *L. vannamei* alimentado con alimentos experimentales con 2 y 9 % de inclusión de hidrolizado de langostilla, a temperatura y salinidad constante. En tanto que Rosas (2000) usando juveniles de *P. setiferus*, encontró que el nivel óptimo de proteínas en el alimento ocasiona que los animales utilicen a los lípidos y proteínas como fuente de energía metabólica, mientras que a niveles mayores de proteína en el alimento (40 y 50%), el metabolismo sea principalmente de proteínas. Esto sugere que los estudios bioenergéticos pueden ser herramientas útiles para conocer el efecto metabólico de ingredientes y aditivos en alimentos para camarones.

Con base a los resultados de consumo de oxígeno y crecimiento en sus equivalentes energéticos para camarón, se calculó un balance energético a 24 horas, estimando indicadores como energía metabolizable y eficiencia neta de retención, que nos permiten conocer la cantidad de energía que es destinada para el crecimiento.

La Tabla XXI muestra el balance de energía metabolizable a 24 horas, basado en camarones alimentados 2 veces al día con alimentos conteniendo 18.97 kJ/g. La energía metabolizable varió de 431.85 a 578.51 J/día y la eficiencia neta de retención de 70.46 a 79.09 % para los organismos alimentados con 45 y 60 % de inclusión de harina de frijol yorimón. El efecto sobre la eficiencia neta de retención se puede traducir como la obtención de los mayores beneficios netos después de haber pagado los costos metabólicos necesarios para el mantenimiento, o bien como la eficiencia para crecer (Rosas *et al.*, 2003).

Existe muy poca información relacionada con el balance de energía para camarones. Ocampo (1998) estableció el presupuesto para *P. californiensis* evaluando 2 niveles de oxígeno y tres temperaturas de cultivo (19, 23 y 27 ° C), encontrando que la eficiencia neta de retención varió de 5.2 a 40.48 %. En tanto que Rosas *et al.* (2003) reportaron que juveniles de *L. setiferus* alimentados con diferentes niveles de carbohidratos (0-80%) destinaron de 44-85% de la energía ingerida hacia el crecimiento. Por lo anterior la eficiencia neta de retención de los juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón, obtenidas en el presente estudio se consideran dentro del rango normal para camarones.

**Tabla XXI. Presupuesto de la energía metabolizable a 24 h y relación oxígeno: nitrógeno (O:N) en juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de harina de frijol yorimón entero(*Vigna unguiculata*).**

Alimento	Metabolismo de rutina (J/día)	Metabolismo post-alimentario (J/día)	Calor total producido <sup>1</sup> (J/día)	Crecimiento (J/día)	Energía metabolizable <sup>2</sup> (J/día)	Eficiencia neta de retención <sup>3</sup> (%)	Relación O:N <sup>4</sup>
Control	99.41	33.82	133.23	441.15	574.38	76.81	0.60
15%	93.57	38.61	132.18	386.15	518.33	74.50	0.33
30 %	103.74	54.58	158.32	354.29	512.60	69.12	0.31
45 %	81.36	46.22	127.58	304.27	431.85	70.46	0.46
60 %	97.63	23.32	120.96	457.56	578.51	79.09	0.53

<sup>1</sup> Metabolismo de rutina + metabolismo post-alimentario; <sup>2</sup> Calor total producido + Crecimiento; <sup>3</sup> (Crecimiento/Energía metabolizable \*100); <sup>4</sup> Se calculó en  $\mu\text{m}^3/\text{g}/\text{min}$  para O<sub>2</sub> y amonio.

Retomando la discusión de los resultados del presente trabajo, se considera que la proteína y los carbohidratos del frijol yorimón son bien digeridos por juveniles de *L. vannamei*, como se ha visto que sucede con otras leguminosas como soya, frijol común y chícharo (Akiyama *et al.*, 1989, Lim y Dominy, 1990, Ávalos-Zubeta, 2001, Davis *et al.*, 2002 ), y que el contenido de inhibidor de tripsina y ácido fítico, que son los principales factores antinutricionales encontrados en estos ingredientes vegetales, es bajo, y que puede ser disminuido por procesos tecnológicos como cocción, germinado y extruido. A pesar de que no se encontró una correlación significativa entre la digestibilidad *in vivo* y los niveles de estos factores antinutricionales.

Otro aspecto importante a considerar en la evaluación de ingredientes para alimentos acuícolas es el efecto sobre el crecimiento de los organismos, por lo que se evaluó el efecto del nivel de inclusión en el alimento para juveniles de *L. vannamei*. Considerando que el crecimiento y el factor de conversión alimenticia no se ve afectado con respecto al alimento

control, que la energía destinada al crecimiento es de aproximadamente 70 %, la harina de frijol yorimón entero puede ser incluido en un 30 % en alimentos para juveniles de *L. vannamei*, equivalente a una sustitución del 50 % de la pasta de soya y harina de trigo. El presente estudio indica el alto potencial de aplicación del frijol yorimón en la industria camaronícola, lo cual puede favorecer el crecimiento del cultivo de esta leguminosa.

## 8. CONCLUSIONES

- El frijol yorimón entero contiene 26.1 % de proteína y 66.3 % de carbohidratos. La proteína cruda aumentó en la harina de frijol yorimón germinado, probablemente por la síntesis de enzimas y la degradación de otros nutrientes, como el almidón.
- El frijol yorimón no se considera una fuente importante de lípidos, calcio y fósforo, ya que los niveles encontrados son muy bajos. Los aminoácidos más abundantes en la harina de frijol yorimón son: ácido aspártico, ácido glutámico y arginina, siendo la metionina el aminoácido limitante, al igual que sucede con otras leguminosas como la soya y lupino.
- La digestibilidad *in vivo* de proteína y carbohidratos del frijol yorimón en alimentos para *Litopenaeus vannamei* se considera buena si se compara con otras leguminosas como la soya y el chícharo, ya que es mayor del 70 %, y puede ser mejorada por el uso de procesos tecnológicos tales como cocción, germinación y extrusión, ya que durante estos procesos, algunos compuestos antinutricionales son inactivados, las proteínas desnaturalizadas y los carbohidratos gelatinizados, lo que ocasiona una mayor susceptibilidad a la degradación enzimática por los camarones.
- La actividad enzimática digestiva del camarón *Litopenaeus vannamei* se vió afectada por la inclusión de las diferentes harinas de frijol yorimón en los alimentos, ya que la actividad tipo tripsina aumentó en los organismos alimentados con frijol yorimón, probablemente debido a la presencia del inhibidor de tripsina en los alimentos.

- No se encontró efecto negativo del nivel de inclusión sobre el crecimiento, sobrevivencia y consumo de alimento, pero sí se observó que con 60 % de inclusión de la harina de frijol yorimón entero, el factor de conversión alimenticia aumenta y disminuye la eficiencia proteica, probablemente por la menor estabilidad en el agua de este alimento.
- El incremento en el calor aparente (ICA) disminuyó a medida que aumentó el nivel de inclusión de la harina de frijol yorimón en los alimentos, por lo que los organismos invierten menor energía durante los procesos de ingestión y digestión de los alimentos.
- El frijol yorimón es fuente de proteínas y carbohidratos, que al ser incluido al 30 % (p/p) en el alimento balanceado en sustitución de ingredientes vegetales como la pasta de soya y la harina de trigo, no afecta negativamente la supervivencia, crecimiento, factor de conversión alimenticia, eficiencia proteica y balance energético del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), se considera que la harina de frijol yorimón entero puede ser usada hasta en un 30 % (p/p) de inclusión en alimentos para juveniles del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

## 9. RECOMENDACIONES

- Debido a que el frijol yorimón es una fuente importante de carbohidratos digeribles, y que se observó que existe una tendencia a disminuir la estabilidad en el agua de los alimentos a medida que aumenta su nivel de inclusión, se recomienda realizar mayores estudios encaminados a determinar las características de los carbohidratos del frijol yorimón que ocasionan este efecto.
- Se recomienda determinar la digestibilidad *in vivo* de los aminoácidos esenciales del frijol yorimón.
- Desde el punto de vista biológico, el frijol yorimón es susceptible de ser usado como ingrediente en alimentos para camarón, se considera importante realizar un estudio económico para determinar su conveniencia considerando el costo de su producción en México, por lo que se recomienda realizar un estudio del costo-beneficio de su uso en la industria de alimentos balanceados para camarón.

## 10. LITERATURA CITADA

- Adbel-Warith, A.A., P.M. Russell y S.J. Davies. 2001. Inclusion of a commercial poultry by-product meal as a protein replacement of fishmeal in practical diets for African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research*, 32:296-305.
- Abery, N.W., R.M. Gunasekera y S.S. De Silva. 2002. Growth and nutrient utilization of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) fingerlings fed diets with varying levels of soybean meal and blood meal. *Aquaculture Research*, 33:279-289.
- Agunbiade S.O. y O.G. Longe. 1999. The physico-functional characteristics of starches from cowpea (*Vigna unguiculata*), pigeon pea (*Cajanus cajan*) and yambean (*Sphenostylis stenocarpa*). *Food Chemistry*, 65:469-474.
- Akiyama, D.M., S.R. Coelho, A.L. Lawrence y E.H. Robinson. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* BOONE. *Nipón Suisan Gakkaishi*. 55:91-98.
- Akiyama, D.M., W.G. Dominy y A. Lawrence. 1992. Penaeid nutrition. En: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier Science Publishers. 535-567 pp.
- Anderson, S.J., S.P. Santosh., D.M. Anderson y M.A. McNiven. 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. *Aquaculture*, 115:305-325.
- Anduaga-Cota, R., A.G. Cota Gastélum, M.R. Falcón-Villa, G. Yáñez-Farías y J.M. Barrón-Hoyos. 2002. Medición de dureza en frijol cocido con una celda de extrusión por alambres: propuesta de una celda de menor tamaño. *Memorias del IV*

Congreso del Noroeste en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo, Sonora.

Angharad, M.R., J. Gatehouse, A. Gatehouse y D. Boulter. 1980. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*). *Phytochemistry*, 19:751-756.

AOAC INTERNATIONAL. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1094 pp.

Ávalos-Zubieta, E. 2001. Utilización del frijol *Phaseolus vulgaris* como fuente proteica en dietas para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. División de Estudios de Posgrado. Monterrey, N.L. México.

Beamish, F. W. H., and Trippel, E.A. 1990. Heat increment: a static or dynamic dimension in bioenergetic models?. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 649-661.

Biliaderis, C.G. 1992. Structures and phase transitions of starch in food systems. *Food Technology*, 46:98-109.

Bortone, E. 2005. SME controls help produce high-quality shrimp feed. *Global Aquaculture Advocate*. 72-74.

Booth, M.A., G.L. Allan, J. Frances y S. Parkinson. 2001. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus* IV. Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. *Aquaculture*, 196:67-85.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72:248-254.
- Brito, R., C. Rosas, M.E. Chimal y G. Gaxiola. 2001. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research*, 32:257-266.
- Brunson, J.F., R.P. Romaine y R.C. Reigh. 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture Nutrition*, 3:9-16.
- Cerecer-Cota, E.E, D. Ricque-Marie, B. Ramírez-Wong, M.G. Salazar-García, M. Velasco-Escudero, L.E. Cruz-Suárez. 2004. Correlación del consumo del alimento peletizado con la dureza del pellet en alimentos con diferente aglutinante. En: Cruz Suárez L.E., D. Ricque Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. November 16-19 2004, Hermosillo, Sonora, México. Pp 84.
- Cheng, Z.J., y R.W. Hardy. 2003. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture nutrition*, 9:77-83.
- Civera, R. y J. Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 77:145-156.

- COSAES. 2005. Informe final camaron ciclo 2005. [www.cosaes.com](http://www.cosaes.com)
- Cousin, M., G. Cuzon, J. Guillaume y AQUACOP. 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. *Aquaculture*, 140:361-372.
- Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M.G. Nieto-López y M. Tapía-Salazar. 1998. Revisión sobre calidad de harinas y aceites de pescado para la nutrición del camarón. pp 298-326 En: Civera-Cerecedo, R., C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie y L.E. Cruz-Suárez. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Cruz-Suárez, L.E. 1998. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. pp. 207-232. En: Cruz Suárez L.E, D. Ricque Marie y R. Mendoza. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 11-13 de Noviembre de 1996. Monterrey, Nuevo León, México.
- Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, I.M. McCallum y D. Hickling. 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*, 196:87-104.
- Cuzon, G., A. Brito, L. Jiménez-Yan, R. Brito, G. García Tomás y G. Gaxiola. 2004. The effects of animal or plant-based diets on energy partitioning in selected ontogenetic stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz Suárez L.E., D. Ricque Marie,

- M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- D'Abramo, L.R., D.E. Conklin y D.M. Akiyama (Eds.). 1997. Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6. World Aquaculture Society.
- Davis, D.A. y C.R. Arnold. 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 114:285-292.
- Davis, D.A. y C.R. Arnold. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 185:291-298.
- Davis, D.A., C.R. Arnold y I. McCallum. 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture nutrition, 8:87-94.
- Davis, A., T.M. Samocha, R.A. Bullis, S. Patnaik, C.L. Browdy, A.D. Stokes y H. Atwood. 2004. Practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): working towards organic and/or all plant production diets. En: Cruz Suárez L.E., D. Ricque Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Dhurandhar, N.V. y K.C. Chang. 1990. Effect of cooking on firmness, trypsin inhibitors, lectins and cystine/cysteine content of navy and red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Food Science, 55:470-474.

- Díaz, F.A. y M.A. Ortégón. 1997. Guía para la producción de vaina y grano de chícharo de vaca en el norte de Tamaulipas. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo experimental Rio Bravo. Publicación No. 21.
- Divakaran, S., M. Velasco, E. Beyer, I. Forster y A. Tacon. 2000. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. In: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Engng. Chem. Analyt. Edm., 18:499-505.
- Erlanger, Kokowsky, y Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. Arch. Biochemical Biophysics, 95:271-278.
- Eskin, N.A.M. y S. Wiebe. 1983. Changes in phytase activity and phytate during germination of two fabean cultivars. Journal of Food Science, 48:270-271.
- Eusebio, P.S. 1991. Effect of dehulling on the nutritive value of some leguminous seeds as protein sources for tiger prawn, *Penaeus monodon*, juveniles. Aquaculture, 99:297-308.
- Ezquerria, J.M., F.L. García-Carreño y N.F. Haard. 1997. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). Journal of Food Biochemistry, 21:401-419.

- Ezquerro, J.M., F.L. García-Carreño, G. Arteaga y N.F. Haard. 1999. Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed with different diets. *Journal of Food Biochemistry*, 23:59-74.
- FAO. 2006. <http://faostat.fao.org/faostat/default.jsp>
- Fennema, O.R. (Ed.). 1996. *Food Chemistry*. 3 Ed. Marcel Dekker, Inc.
- Fenucci, J.L., A.C. Fenucci, A.L. Lawrence y Z.P. Zein-Eldin. 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp, *Penaeus stylirostris*. *Proc. World Maricult. Soc.*, 13:134-145.
- Folch-Lees, J. y G.H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 26:497-509.
- Fox, J.M., A.L. Lawrence y F. Smith. 2004. Development of a low fish meal feed formulation for commercial aquaculture production of *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz Suárez L.E., D. Ricque Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. 2004. *Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola*. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Francis, G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199:197-227.
- Galicia, G.A. 2003. Utilización del hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como aditivos en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.

Gallardo, P.P., R. Pedroza, A. Brito, G. Cuzon y G. Gaxiola. 2004. Uso de alimentos artificiales con hidrolizados proteicos de origen marino en la larvicultura de camarones peneidos: Efecto sobre la respuesta nutrimental y balance energético. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Gandolfi, A.J. 1981. *Journal of liquid Chromatography*, 4(4):565-586.

García-Carreño, F.L., M.P. Hernandez-Cortes y N.F. Haard. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and marine decapod. *J. Agric. Food Chem.*, 42:1456-1461.

Garg, S.K., A. Kalla y Bhatnagar. 2002. Evaluation of raw and hydrothermically processed leguminous seeds as supplementary feed for the growth of two Indian major carp species. *Aquaculture Research*, 33:151-163.

Glencross, B.D. 2001. Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Department of fisheries. Research Division Government of Western Australia.

Gomes, E.F., G. Corraze y S. Kaushik. 1993. Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapessed and peas) on growth, nutrient utilization and

- muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 113:339-353.
- Gouveia, A., y S.J. Davies. 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 182:183-193.
- Graham, P., y C. Vance. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 31:872-877.
- Jackson, M.L. 1958. Soil chemical analysis. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, W. J.
- Jones, B.B. y J.P. Gilligan. 1983. O-Ophthalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolisates and physiological fluids.
- Kakade, M.L., J.J. Rackis, J.E. McGhee y G. Poski. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity in soy products. A collaborative analysis of Improved Procedure. *Cereal Chemistry*, 51:376.
- Keembiyehetty, C.N. y S.S. de Silva. 1993. Performance of juvenile *Oreochromis niloticus* (L.) reared on diets containing cowpea, *Vigna catiang*, and black gram, *Phaseolus mungo*, seeds. *Aquaculture*, 112:207-215.
- Kikuchi, K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 179:3-11.
- Kochhar, N., A.F. Walker y D.J. Pike. 1988. Effect of variety on protein content, aminoacid composition and trypsin inhibitor activity of cowpeas. *Food Chemistry*, 29:65-78.

- Kureshy, N. y A.D. Davis. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204:125-143.
- Le Moullac, G., A. Van Wormhoudt y AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquatic Living Resources*, 7:203-210.
- Le Moullac, G., B. Klein, D. Sellos y Van Wormhoudt. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amilase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 208:107-125.
- Lehninger, A.L. 1995. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1117 p.
- Lecuona-Villanueva, A., J. Torruci-Uco, L. Chel-Guerrero y D. Bentacur-Ancona. 2006. Physicochemical characterization of mexican cowpea (*Vigna unguiculata*) tailing starch. *Starch/Stärke*, 58:25-34.
- Lemos D., J.M. Ezquerro y F.L. García-Carreño. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186:89-105.
- Lim, C. y W. Dominy. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp. *Aquaculture*, 87:53-63.

- Lim, C., R.M. Beames, J.G. Eales, A.F. Prendergast, J.M. Mcleese, K.D. Shearer y D.A. Higgs. 1997. Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture nutrition*, 3:269-279.
- Lucas, A. 1993. *Bioénergétique des animaux aquatiques*. Masson, Paris.110p.
- Longe, O.G. 1980. Carbohydrate composition of different varieties of cowpea *Vigna unguiculata*. *Food Chemistry*, 6:153-161.
- Mahadevappa, V.G. y P.L. Raina. 1981. Sterols, esterified esterols and glycosylated sterols of cowpea *Vigna unguiculata* lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29:1225-1227.
- Martínez, B., M.V. Ibáñez y F. Rincón. 2002. Ácido fítico: Aspectos nutricionales e implicaciones analíticos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52:219-231.
- Martinez-Palacios, C.A., M.C. Chávez-Sánchez, M.A. Olvera-Novoa y M.I. Abdo de la Parra. 1996. Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 11-13 de Noviembre de 1996. Monterrey, Nuevo León, México.
- Maugle, P., O. Deshimaru, T. Katayama y K. Simpson. 1982. Effect of short necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48:1759-1764.

- Mayer, A.M. y A. Poljakoff-Mayber. 1982. The germination of seeds. Pp.85-138. Pergamon Press. Ltd. U.K.
- Maynard, L.A., J.K. Loosli, H.F. Hintz y R.G. Warner. 1981. Nutrición animal. 4ª Ed. McGraw Hill. U.S.A.
- Mayzaud, P. y Conover R.J., 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. Mar. Ecol. Prog. Ser. 45, 289-302.
- Molina, P.C. 2000. Disminución de la proteína en el alimento del camarón como una estrategia para reducir el impacto ambiental. Pp. 574-586. En: Civera-Cerecedo, R.; Perez-Estrada, C.J.; Ricque-Marie, D. Y Cruz-Suarez, L.E. (Eds) Avances en Nutrición acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S. México.
- Murillo-Amador, B., E. Troyo-Diéguez, J.L. García-Hernandez, L. Landa-Hernández y J.A. Larrinaga-Mayoral. 2000. El frijol Yorimón Leguminosa tolerante a sequía y salinidad. Programa de Agricultura en Zonas Áridas. Publicación de Transferencia y divulgación No. 2. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México.
- Murray, D. 2004. Canola protein concentrate as a feed ingredient for salmonid fish. En: Cruz Suárez L.E., D. Ricque Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

- Nelson, T.S. 1980. Phosphorus availability in plant origin feedstuffs for poultry and swine. Proc. Florida Nutrition. 59-84.
- Nielsen, S.S., T.A. Ohler y C.A. Mitchell. 1997. Cowpea leaves for human consumption: production, utilization, and nutrient composition. En: Singh, B.B., D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell y L.E.N. Jackai. (Eds.) Advances in cowpea research. Internacional Institute of Tropical Agricultura, Ibadan, Nigeria y Japan Internacional Research Center for Agricultural Sciences Tsukuba, Ibaraki, Japan.
- Nieto-López, M.G. 2003. Desarrollo de una técnica de digestibilidad in vitro para el control de calidad de harinas de pescado y alimentos para camarón. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. División de estudios de Posgrado. San Nicolás de los Garza, N.L. México.
- Nnanna, I.A., y D. Phillips. 1990. Protein and starch digestibility and flatulence potential of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*). Journal of Food Science, 55(1):151-153.
- Obaldo, L.G., W.G. Dominy J.H. Terpstra, J.J. Cody, y K.C. Behnke. 1998. The impact of ingredient particle size on shrimp feed. Journal of Applied Aquaculture. 8:55-66.
- Obaldo, L.G., W.G. Dominy y G.H. Ryu. 2000. Extrusion processing and its effect on aquaculture diet quality and shrimp growth. Journal of Applied Aquaculture, 10:41-53.
- Oberleas D. 1983. Phytate content in cereals and legumes and methods of determination. Cereal Food World. 28:352-357.

- Ocampo, V.L. 1994. Evaluación del efecto de la temperatura y del peso en el consume de oxígeno del camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes 1900) (Decapoda:Penaeidae). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California, Sur.
- Ocampo, V.L. 1998. Efecto del oxígeno disuelto y temperatura en el crecimiento, metabolismo respiratorio y energética de juveniles de camarón café *Penaeus californiensis*. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.
- Ologhobo, A.D. y .L. Fetuga. 1984. Effect of processing on the trypsin inhibitor, haemagglutinin, tannis acid and phytic acid contents of seeds of ten cowpea varieties. Trop. Agric., 61(4):261-264.
- Oluwatosin, O.B. 1997. Genetic and enviromental variation for seed yield, protein, lipid and aminoacid composition in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp). Journal of the Science of Food and Agriculture, 74:107-116.
- Olvera-Novoa, M.A. 1994. Cuantificación de óxido de cromo en heces y alimentos. Nutrition of fish and crustaceans. pp. 1-33. En: A laboratory manual FAO (Ed.). Project. Field Document 19.
- Olvera-Novoa, M.A., F. Pereira-Pacheco, L. Olivera-Castillo, V. Pérez-Flores, L. Navarro J. Sámano. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata*) protein concentrate as replacement for fish meal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*)fry. Aquaculture, 158:107-116.

- Olvera-Novoa, M.A. y L. Olivera-Castillo. 2000. Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente de proteína en alimentos para peces. En: Cruz-Suárez, Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M. y Olvera-Novoa, M. A. Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición acuícola. Mérida, Yucatán, México.
- Osman-Ismail, F. 1972. En: Arora S.K. 1983. Chemistry and biochemistry of legumes. Edward Arnold Publishers Ltd. U.K. Pp.64-66.
- Puzon, J. y G.C. Rivero. 1997. Changes in total lipids, fatty acid profiles and cytoplasmic leakage in germinating cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp.*) seeds. Life Sciences, 6:57-76.
- Re, A.D., F. Díaz, E. Sierra y S. Gómez-Jimenez. 2004. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. Ciencias Marinas, 30(3):443-453.
- Regnault, M. 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon L.* metabolic response to prolonged starvation. Journal Comparative Physiology, 141:549-555.
- Rodríguez, A., L. Le Vay, G. Mourente y D.A. Jones. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. Marine Biology, 118:45-54.

- Romero, J.J., E. Castro, A.M. Díaz, M. Reveco y J. Zaldívar. 1994. Evaluation of methods to certify the “premium” quality of chilean fish meals. *Aquaculture*, 124:351-358.
- Rosas, C., Sanchez A., Díaz, E., Soto, L.A., Gaxiola, G., Brito R. 1996. Effect of dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae. *Journal of The World Aquaculture Society*, 27: 92-102.
- Rosas, C., E. Martínez, G. Gaxiola, E. Díaz, R. Brito y L. Soto. 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. *Ma. Ecol. Prog. Ser.*, 174:67-75.
- Rosas, C. 2000. Bioenergética de camarones peneidos: una forma de comprender los mecanismos fisiológicos involucrados en la nutrición. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie y R. Mendoza (Eds) *Avances en Nutrición Acuícola III*. Monterrey, Nuevo León, México, 11 al 13 Noviembre 1996.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G. Toboada, L. Arena y A.V. Wormhoudt. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268:47-67.
- Rosas, C., A. Sánchez, M.E. Chimal y R. Brito. 2003. Manual de métodos para la evaluación del Balance energético en crustáceos. *Jornadas Iberoamericanas de Nutrición en Acuicultura. Avances de la Nutrición de camarones peneidos: Hacia la optimización*

de alimentos y estrategias de alimentación para una camaronicultura sustentable. Centro de formación de la Cooperación Española en Cartagena de Indias, Colombia, 7 a 11 Julio de 2003.

Russell, P.L. y B.O. Juliano, 1983. Differential scanning calorimetry of rice starches. *Starch/Stärke*, 11:382.

SAGARPA. 2004. Anuario estadístico de pesca. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>

Sapp, R.E. y S.D. Davidson. 1991. Microwave digestion of multi-component foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Science*, 55(5).

Satoh, S., D.A. Higgs, B.S. Dosanjh, R.W. Hardy, J.G. Eales y G. Deacon. 1998. Effect of extrusion processing on the nutritive value of canola meal for Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater. *Aquaculture nutrition*, 4:115-122.

Sefa-Dedeh, S., Y. Kluvitse y E.O. Ofoakwa. 2001. Influence of fermentation and cowpea steaming on some quality characteristics of Maite-cowpea blends. *African Journal of Science and Engineering Series*, 2:71-80.

Schoch, T.J. y E.C. Maywald. 1968. Preparation and properties of various legume starches. *Cereal Chemistry*, 45:565-573.

Stickney, R.R., R.W. Hardy, K. Koch, R. Harold, D. Seawright y K.C. Masee. 1996. The effects of substituting selected oilseed protein concentrates for fishmeal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets. *Journal of World Aquaculture Society*, 27:57-63.

- Sudaryono A., E. Tsvetnenko, J. Hutabarat, Supriharyono y L.H. Evans. 1999. Lupin ingredients in shrimp (*Penaeus monodon*) diets: influence of lupin species and types of meals. *Aquaculture*, 171:121-133.
- Sunday G., A. Monday y E. Juliet. 2001. Evaluation of selected food attributes of four advanced lines of ungerminated and germinated Nigerian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 56:61-73.
- Tacon, A. 1989. Nutrición y Alimentación de peces y camarones cultivados. Programa Cooperativo Gubernamental. FAO-Italia. Proyecto AQUILA II. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
- Tacon, A.G., J.L. Webster y C.A. Martinez. 1984. Use of solvent extracted sunflower seed meal in complete diets for fingerling rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Aquaculture*, 43:381-389.
- Tacon, A.G., G. Nates y R.J. McNeil. 2004. Dietary feeding strategies for marine shrimp: a review. En: Cruz Suárez L.E., D. Ricque Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Tan, R.K.H. y E.G. Dominy. 1997. Comercial pelleting of crustacean feed. pp. 520-549. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.) *Crustacean Nutrition*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA., USA.

- Thiessen, D.L., G.L. Campbell y P.D. Adelizi. 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture nutrition*, 9:67-75.
- Tshovhote, N.J., A.E. Nesamvuni, T. Raphulu y R.M. Gous. 2003. The chemical composition, energy and aminoacid digestibility of cowpeas used in poultry nutrition. *South African Journal of Animal Science*, 33:65-69.
- Umagat, H., P. Lucera y L.F. Wen. 1982. Total aminoacid analysis using pre-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography*, 239:463-474.
- Urbano, G., P. Aranda, E. Gómez-Villalva, S. Frejnagel, J.M. Porres, J. Frías, C. Vidal-Valverde, y M. López-Jurado. 2003. Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal and with and without added phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2415-2420.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco y R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106 B.
- Von Elbe, J.H. y S.T. Schwartz. 1996. Colorants. Fennema (Ed.). *Food Chemistry*. 3 Ed. Marcel Dekker, Inc. 651-721.
- Wheeler, E.L. y R.E. Ferrel. 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.*, 48:312-320.

- Yañez-Farias, G.A., J.G. Moreno-Valencia, M.R. Falcón-Villa, y J.M. Barrón-Hoyos. 1997. Isolation and partial characterization of starches from dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and chickpeas (*Cicer arietinum*), grown in Sonora, Mexico. *Starch/ Stärke*, 49:341-345.
- Xue, M. y Y. Cui. 2001. Effect of several feeding stimulants on diet preference by juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), fed diets with or without partial replacement of fish meal by meat and bone meal. *Aquaculture*, 198:281-292.

## **ANEXO I**

**Digestibilidad *in vitro* de las diferentes harinas de frijol yorimón (*V. unguiculata*).**

INGREDIENTE	TORRY	AOAC
FYE entero	31.69 <sup>a</sup> ±3.96	57.19 <sup>a</sup> ±6.05
FYE decorticado	32.70 <sup>a</sup> ±7.24	74.23 <sup>b</sup> ±4.03
FYE cocido	42.26 <sup>a</sup> ±10.88	88.72 <sup>c</sup> ±2.07
FYE germinado	35.75 <sup>a</sup> ±3.46	66.27 <sup>ab</sup> ±2.46
FYE extruido	41.83 <sup>a</sup> ±-3.39	85.6 <sup>c</sup> ±0.208

**Firmeza de los alimentos con 15 % de inclusión de las harinas de frijol yorimón (*V. unguiculata*) elaboradas por diferentes procesos usados en el ensayo de digestibilidad *in vivo* para *L. vannamei*.**

Alimento	Firmeza (J/g)
Control	2.03 <sup>ab</sup> ±0.91
Entero	3.24 <sup>b</sup> ±0.77
Decorticado	2.05 <sup>ab</sup> ±0.41
Cocido	2.79 <sup>b</sup> ±1.21
Germinado	2.26 <sup>ab</sup> ±0.25
Extruido	1.08 <sup>a</sup> ±0.41

**Excreción de amonio de juveniles de *L. vannamei* alimentados con diferentes niveles de inclusión de harina de frijol yorimón entero (*V. unguiculata*).**

Alimento	Excreción de amonio	
	Rutina	Post-alimentario
Control	0.0007 <sup>a</sup> ±0.0003	0.0018 <sup>ab</sup> ±0.0005
15 %	0.0009 <sup>a</sup> ±0.0004	0.0034 <sup>a</sup> ±0.0012
30 %	0.0009 <sup>a</sup> ±0.0003	0.0032 <sup>a</sup> ±0.0014
45 %	0.0010 <sup>a</sup> ±0.0002	0.0019 <sup>ab</sup> ±0.0006
60 %	0.0005 <sup>a</sup> ±0.0001	0.0015 <sup>b</sup> ±0.0004