

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Efecto del ensilaje de grillo *Acheta domesticus* en los parámetros productivos de camarón *Litopenaeus vannamei* en sustitución parcial a total de la harina de pescado

T E S I S

PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ABRIL KARINA MAURO FÉLIX

Ensenada, Baja California, México. Agosto, 2023.

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**Efecto del ensilaje de grillo *Acheta domesticus* en los parámetros
productivos de camarón *Litopenaeus vannamei* en sustitución
parcial a total de la harina de pescado**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ABRIL KARINA MAURO FÉLIX

Aprobada por:



Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dr. Oscar Basilio del Río Zaragoza
Sinodal



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal



Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante **Abril Karina Mauro Félix**, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Efecto del ensilaje de grillo *Acheta domesticus* en los parámetros productivos de camarón *Litopenaeus vannamei* en sustitución parcial a total de la harina de pescado.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 1 de agosto de 2023



Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante **Abril Karina Mauro Félix**, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Efecto del ensilaje de grillo *Acheta domesticus* en los parámetros productivos de camarón *Litopenaeus vannamei* en sustitución parcial a total de la harina de pescado.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 1 de agosto de 2023



Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Sinodal

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría**

Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante **Abril Karina Mauro Félix**, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Efecto del ensilaje de grillo *Acheta domesticus* en los parámetros productivos de camarón *Litopenaeus vannamei* en sustitución parcial a total de la harina de pescado.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 1 de agosto de 2023



Dr. Oscar Basilio del Río Zaragoza
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante **Abril Karina Mauro Félix**, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Efecto del ensilaje de grillo *Acheta domesticus* en los parámetros productivos de camarón *Litopenaeus vannamei* en sustitución parcial a total de la harina de pescado.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 1 de agosto de 2023



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONAHCyT por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto de investigación.

A mi directora de tesis la Dra. María Teresa Viana Castrillón, por admitirme como su estudiante, guiarme durante el proyecto y motivarme a seguir aprendiendo.

A mis sinodales, por haber aceptado ser parte de mi comité, por brindar su valiosa orientación, a mejorar y contribuir en el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, a la Facultad de Ciencias Marinas y en especial al Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva (UABC) y Laboratorio de Acuicultura (CICESE) por brindarme la oportunidad de hacer uso de sus instalaciones y equipo en el desarrollo de análisis para este proyecto.

A los técnicos Aurora y Alonso del Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva (UABC) y al técnico Abelardo del Laboratorio de Acuicultura (CICESE) por la confianza que depositaron en mí al permitirme utilizar las instalaciones y equipo y principalmente por la orientación y asistencia al resolver mis dudas en cada proceso realizado.

A mis compañeros de laboratorio Abraham, Escarlet y Andrea por su colaboración, consejos y respaldo durante este proyecto.

A los doctores Eulalio y Emyr por sus comentarios constructivos en el mejoramiento de esta investigación, por la motivación académica y personal para enfrentar los desafíos futuros.

A mis padres que me apoyaron, me respaldaron e impulsaron a enfrentar los altibajos durante el desarrollo de este proyecto y en mi vida.

Resumen

La búsqueda de distintas fuentes proteicas ha tomado gran interés por la sustitución de la harina de pescado en las dietas para organismos acuáticos. Sin embargo, no todas las fuentes han resultado adecuadas tanto por ser deficientes en aminoácidos esenciales o por la disponibilidad o precio debido a la competencia con la alimentación pecuaria. El grillo *Acheta domesticus* como fuente proteica es una de las vías potenciales en reemplazo de la harina de pescado. La presentación de grillo en un ensilaje ácido hidrolizado (EAHG) es una propuesta novedosa y sostenible que pretende tener la disponibilidad de los macro y micronutrientes de la especie. Adicionalmente, el proceso de ensilar conlleva a reducir la huella de carbono al poder conservarlo a temperatura ambiente, sin afectar la calidad y pérdida de nutrientes. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del EAHG sobre el desempeño, el crecimiento, digestibilidad, y salud, del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* en sustitución parcial a total de la harina de pescado (HP). Con este fin, se prepararon cuatro dietas isoproteicas e isolipídicas con 0, 8.2, 16.5, y 24.7% de ensilaje de grillo en sustitución de la HP. 15 camarones se distribuyeron aleatoriamente con peso total de $4.3 \pm 0.01\text{g}$, en 12 estanques y se alimentaron a saciedad cuatro veces al día (8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 hrs) durante ocho semanas. Después de las ocho semanas, el peso final de los camarones se vio significativamente afectado, disminuyendo conforme aumentó el contenido de ensilaje ácido hidrolizado de grillo (EAHG) en la dieta. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en supervivencia, el índice hepatosomático (HSI) de los organismos, ni en la digestibilidad aparente de las dietas. Con el fin de determinar la causa del bajo crecimiento de los camarones alimentados con las dietas que contenían el EAHG, se determinó el contenido de quitina en el ensilaje, encontrando un contenido de 26%, lo cual resultó ser mayor al esperado para la especie (12%), y bajo el cual se formularon las dietas. Lo anterior nos lleva a suponer que, al encontrar más quitina a la reportada para esta especie, la cantidad reportada como proteína cruda sobreestimó el contenido de proteína que debería participar en el crecimiento. Es decir, aun cuando las dietas se formularon isoproteicas, al haber mayor cantidad de nitrógeno no proteico (NNP) al esperado, resultó en menor contenido de proteína. Es así como se explica el efecto negativo en crecimiento al ir agregando más niveles de ensilaje de grillo. Con relación a los ácidos grasos de cadena larga (LC-PUFAs), disminuyeron conforme se

agregó el EAHG, reflejando su contenido en el hepatopáncreas. Finalmente se observó que, en la hemolinfa, la proteína total y colesterol no mostraron diferencias significativas, mientras que el contenido de glucosa fue significativamente menor en el tratamiento medio (D-Medio) mientras que el resto permaneció similar. Se concluye que es importante conocer el contenido de quitina antes de formular las dietas para evitar la sobreestimación de la proteína cruda. Además de que en el presente trabajo expone que el EAHG puede limitar el crecimiento del camarón en el remplazo de la harina de pescado, por lo que se recomienda evaluar nuevamente el efecto de estas dietas corrigiendo el nitrógeno no proteico para asegurar que el nivel de proteína dirigida a crecer esté en un nivel similar antes de tomar una conclusión. Por otro lado, no se observaron efectos negativos en la fisiología y estado de salud de los organismos.

Palabras clave: Ensilaje ácido hidrolizado de grillo, sustitución, harina de pescado, camarón *Litopenaeus vannamei*.

ÍNDICE

Página

Lista de Cuadros.....	i
Lista de Figuras	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	13
III. HIPÓTESIS	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Elaboración de ensilaje ácido hidrolizado de grillo	14
4.2. Elaboración de dietas	15
4.3. Bioensayo y aporte de alimentación	16
4.4. Análisis químicos proximales	18
4.5. Índices productivos	20
4.6. Determinación del contenido de ácidos grasos	21
4.7. Digestibilidad aparente en materia seca.....	22
4.8. Perfil de aminoácidos.....	23
4.9. Análisis de la hemolinfa.....	24
4.10. Cuantificación de quitina	25
V. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	26
VI. RESULTADOS	27
6.1. Ensilaje de grillo.....	27
6.2. Composición proximal del ensilaje	27
6.3. Ácidos grasos del ensilaje	28
6.4. Aminoácidos en grillo	28
6.5. Quitina presente en grillo	30
6.6. Composición nutrimental de dietas, biomasa y hepatopáncreas	31
6.7. Desempeño productivo.....	34
6.8. Perfil de ácidos grasos en las dietas y camarones (% de ácidos grasos totales).....	37
6.9. Digestibilidad aparente en porcentaje de la dieta	45
6.10. Perfil de aminoácidos reportados como g/ 100g de aminoácidos	45

6.11. Análisis bioquímico en hemolinfa.....	49
VII. DISCUSIÓN.....	50
VIII. CONCLUSIONES.....	57
IX. RECOMENDACIONES	57
X. BIBLIOGRAFÍA.....	58

Lista de Cuadros

<i>Cuadro</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
Cuadro 1.	<i>Formulación teórica de cuatro dietas experimentales con inclusión de ensilaje ácido hidrolizado de grillo con diferente porcentaje de inclusión.</i>	16
Cuadro 2.	<i>Distribución de dietas experimentales en sistema experimental de camarones L. vannamei.</i>	18
Cuadro 3.	<i>Análisis proximal de ensilaje vs. grillo seco.</i>	28
Cuadro 4.	<i>Ácidos grasos identificados en ensilaje ácido hidrolizado de grillo.</i>	28
Cuadro 5.	<i>Perfil de aminoácidos en grillo (g/100g de proteína).</i>	29
Cuadro 6.	<i>Quitina en ensilaje y grillo seco dado en g / 100g.</i>	31
Cuadro 7.	<i>Análisis proximal de dietas dados en g / 100 g.</i>	32
Cuadro 8.	<i>Proximales químicos en músculo de camarón g / 100 g de tejido seco.</i>	33
Cuadro 9.	<i>Análisis en muestras de hepatopáncreas de camarón g / 100 g de tejido.</i>	34
Cuadro 10.	<i>Datos de crecimiento y rendimiento productivo de camarón L. vannamei.</i>	36
Cuadro 11.	<i>Identificación de ácidos grasos presentes en dietas (% del total de ácidos grasos).</i>	38
Cuadro 12.	<i>Ácidos grasos en músculo de camarón blanco del Pacífico.</i>	40
Cuadro 13.	<i>Identificación de ácidos grasos en hepatopáncreas.</i>	42
Cuadro 14.	<i>Valores de digestibilidad aparente en materia seca (%) (MS) en camarón L. vannamei de las dietas experimentales.</i>	43
Cuadro 15.	<i>Porcentaje (%) total de aminoácidos en dieta y músculo con relación a los aminoácidos totales.</i>	45
Cuadro 16.	<i>Análisis bioquímico en hemolinfa de camarón L. vannamei.</i>	47

Lista de Figuras

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
<i>Figura 1.</i>	<i>Sistema experimental de 12 estanques para bioensayo de los camarones blanco del Pacífico L. vannamei.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2.</i>	<i>Equipo y kits de monitoreo de parámetros de salinidad, temperatura y calidad de agua.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3.</i>	<i>Valores de pH del proceso de ensilaje ácido hidrolizado de grillo.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4.</i>	<i>Perfil del porcentaje (%) total de aminoácidos en ensilaje ácido hidrolizado y grillo seco.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 5.</i>	<i>Músculo y hepatopáncreas de camarón blanco del Pacífico comparado entre dieta D-Control.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 6.</i>	<i>Dieta D-Bajo comparado en músculo y hepatopáncreas de camarón camarón L. vannamei.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 7.</i>	<i>Comparación de dieta D-Medio en músculo y hepatopáncreas de camarón L. vannamei.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 8.</i>	<i>Comparación de la dieta D-Alto con respecto músculo y hepatopáncreas de camarón blanco del Pacífico.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 9.</i>	<i>Perfil del porcentaje (%) total de aminoácidos en dietas experimentales.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 10.</i>	<i>Perfil del porcentaje (%) total de aminoácidos en el músculo del camarón L. vannamei.</i>	<i>48</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. Camaronicultura, importancia comercial

1.1. Sistemas de cultivo del camarón (intensivo, semi-intensivo, extensivo)

El cultivo de camarón es de gran importancia comercial principalmente en países de Asia y América latina. Su producción ocupa el tercer lugar a nivel mundial con 11.2 millones de toneladas en peso vivo. En comparación, la producción de moluscos (17.7 millones de toneladas) ocupa el segundo lugar y el cultivo de peces como primera actividad productiva, teniendo 57.5 millones de toneladas en biomasa. En México en el 2020 se produjo alrededor de 189 mil toneladas de peso vivo en camarón (FAO, 2022). Esta actividad económica ocupa el segundo lugar a nivel nacional, representada por estados como Sonora, Sinaloa y Nayarit con la mayor producción de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, gracias a las condiciones territoriales, climáticas y ambientales que presentan sus zonas costeras.

Por otro lado, la implementación de los sistemas de cultivo varía con respecto a las densidades en biomasa, recambio de agua, área superficial de cultivo, tipo de alimentación y rendimiento económico de producción (Arredondo, 2002). Por lo que, es posible ajustar el tipo de cultivo a las demandas comerciales que la especie representa, así como a las condiciones de desarrollo de cada área específica. El definir el tipo de manejo de producción permite optimizar el cultivo de camarón. Por lo anterior, se puede propiciar un balance entre calidad de agua, productividad primaria y disminución de consumo de alimento formulado, criterios que definen el nivel de intensificación del cultivo. En un sistema extensivo se requiere de 5 a 20 hectáreas para producir de 100 a 500 kg/Ha de camarón en un tiempo aproximado de 5 meses. Mientras que un sistema semi-intensivo requiere de 1 a 10 hectáreas para producir entre 500 a 3,000 kg/Ha de biomasa en un periodo de 4 meses. Por otra parte, un sistema intensivo maneja un área superficial de 1 a 2 hectáreas con producciones de hasta 10,000 kg/Ha de biomasa en 3 ciclos de cosecha por año (Anaya, 2005; FAO, 2009). Los sistemas de producción, a su vez, están también asociados al nivel de desarrollo del área, es decir a los costos por m² del terreno por hectárea, así como la electrificación y costo de mano de obra. Es decir, la producción intensiva requerirá electrificación para bombear oxígeno y eventualmente agua a los sistemas. Por lo anterior se requerirá mayor número de empleados

altamente calificados, que, a su vez, se encontrarán en zonas donde los terrenos sean más caros, aunado al costo de la electricidad.

Además del sistema de manejo de producción, la elección de la especie de cultivo es primordial. El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* es redituable y con un excelente mercado a nivel mundial. Es una especie de fácil domesticación por tolerar temperaturas de hasta 35°C. Habita aguas eurihalinas e inclusive tiene rangos de tolerancia en pH entre 5 a 9 (INAPESCA, 2018).

Con el conocimiento de las características biológicas, metabólicas y fisiológicas del camarón ha sido posible frenar y contener las posibles enfermedades patológicas que pueden presentarse en los sistemas de cultivos. Además, el tener en cuenta la fluctuación de precios, la disponibilidad y sostenibilidad de los ingredientes utilizados en las formulaciones es de suma importancia para optimizar las dietas balanceadas. Éstas deberán contener entre 45 a 37% de proteína de alta calidad para obtener una digestibilidad eficiente y conseguir un aumento de biomasa con menores tasa de mortandad, lo que contribuirá a un adecuado aporte de nutrientes para fomentar la salud y el bienestar del camarón.

2. Calidad y eficiencia de la harina y aceite de pescado en la producción de camarón

La nutrición se enfoca en evaluar el proceso metabólico y fisiológico que proporciona los macro y micronutrientes para transformarlos en energía y estructuras bioquímicas para el funcionamiento de un organismo vivo (Ayisi *et al.*, 2017). Por ende, el aporte de proteínas, lípidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales son los nutrientes que garantizan el crecimiento, la eficiencia del sistema inmune y el rendimiento en la producción de *L. vannamei* (NRC, 2001).

Los requerimientos nutricionales necesarios en el camarón blanco del Pacífico han sido proporcionados principalmente por la harina de pescado, ya que se ha determinado que contiene 68% de proteína y 11% de lípidos. También, sus lípidos son fuente de ácidos grasos esenciales como el araquidónico (omega-6), DHA y EPA (omega-3). Contiene aminoácidos esenciales tales como arginina, metionina, lisina, entre otros. Son ricos en vitamina A, B, D y minerales como calcio, fósforo, hierro, entre otros. Además de este ingrediente, la inclusión

de aceite de pescado los convierte en las principales fuentes de proteína y lípidos de la alimentación de camarón y de peces comerciales como salmón, lobina, carpa, etc. (Cho & Kim, 2011; Hua *et al.*, 2019) convirtiéndose en las materias primas de excelencia en la acuicultura. El recurso utilizado para la producción de harina se obtiene principalmente de la pesca. Tan solo en el 2020 la FAO, (2022) reportó que se destinaron 16 millones de toneladas de pelágicos menores a la producción de harina y aceite de pescado de los 20 millones de toneladas reservados a uso no alimentario. Por otra parte, el IFFO (2022) detalló que, el valor económico estimado en la producción de harina a nivel mundial fue 8.1 millones de dólares (USD) en 2021 y se prevé que habrá una tasa de crecimiento de 4.1% con valor de 10.3 millones de dólares (USD) para el 2027. Esto indica una gran demanda de consumo de harina y aceite de pescado para la acuicultura.

Es bien sabido que el consumo directo de aceite de pescado para el ser humano, en forma de emulsiones o encapsulados (Valenzuela *et al.*, 2012) pudiera ser un factor que, ha generado que los costos de adquisición de las materias primas vayan en aumento. Dando lugar a que su disponibilidad sea limitada por la alta demanda ejercida haciéndola económicamente insostenible para su uso en la producción animal.

Inicialmente, en los años 60s o 70s del siglo pasado, el consumo de harina y aceite de pescado era destinado al sector pecuario para la alimentación de cerdos y aves de corral. Sin embargo, con el auge en los sistemas productivos acuícolas, la harina de pescado ha tenido exclusividad en este sector. Tan solo en 2010 el 73% de la harina de pescado producida a nivel mundial fue destinada a la acuicultura, mientras que el 20% fue para aves y cerdos y el resto fue empleado en alimentos para mascotas (FAO, 2010; Shepherd & Jackson, 2013). La demanda que se ejerce sobre estos ingredientes ha incitado a que los costos de producción sean elevados. Por tanto, el acceso a la materia prima tiende a ser menor para los productores acuícolas y terrestres. En México de acuerdo con la CONAFAB (2021) se utiliza solo el 7% de harina de pescado a lechones recién destetados en un periodo de 3 semanas, esto se debe a que el precio de la harina de pescado la hace incosteable en dietas con prolongados lapsos de tiempo.

Además del elevado costo productivo de la harina de pescado, existen otros factores que limitan su disponibilidad como: la pérdida de calidad en la harina, la generación de problemas ambientales por el proceso industrial y la sobrepesca de las especies marinas utilizadas para su producción. La harina y aceite de pescado son obtenidos de un proceso industrial de cocción, prensado, secado y molienda de pescado crudo y de subproductos obtenidos del procesamiento de pesquerías. Es crucial que el producto crudo a procesar sea lo más fresco posible para evitar la degradación y descomposición de la materia por microorganismos presentes en el ambiente. Dentro de la fábrica se somete a una cocción de entre 95°C a 100°C por 20 minutos o menos con la finalidad de detener las actividades enzimáticas y bacterianas presentes, además de facilitar la separación de la fase sólida y líquida del producto. Después se prensa para exprimir la mayor cantidad de sobrenadante de la fase sólida y así obtener el licor de aceite (aceite, agua y proteína soluble) y reducir la mayor cantidad de humedad de la harina.

Para cada tipo de producto se aplica un proceso distinto para la obtención final de los ingredientes. Para el caso del aceite se realiza la centrifugación y purificación del licor. Mientras que la harina se seca, aplicando temperaturas no mayores a 100°C para minimizar la humedad y finalmente se somete a molienda para reducir el tamaño de grosor de las partículas obtenidas en el secado y así facilitar su homogeneización en las dietas pertinentes (Bernales, 2020; FAO, 1986; Shepherd & Jackson, 2013). Sin bien, la inexactitud en el control y monitoreo de la temperatura puede generar, no sólo la proliferación de microorganismos, sino la contaminación y liberación de toxinas en la materia prima. Cualidades que, de no tener un almacenamiento adecuado del producto final, puede provocar absorción de humedad, crecimiento de microorganismos y, por ende, degradación de nutrientes, rancidez y oxidación de ácidos grasos (Henry *et al.*, 2015), lo que conllevaría a la pérdida de la calidad nutricional de la harina.

2.1. Problemas ambientales y la industria harinera

Otro factor negativo importante dentro de la industria harinera es la generación de CO₂, algunos gases de efecto invernadero (GEI). Además, de este elevado gasto de energía y vertimiento de aguas residuales en ríos y zonas costeras, su producción en general conlleva

a un deterioro ambiental (Friedlingstein *et al.*, 2022). Dicho gasto de energía se refiere al uso de calderas, prensas y hornos de secado, además del transporte y el almacenamiento de las materias primas (Bernaes, 2020; MacLeod *et al.*, 2020). Lo anterior propicia un elevado gasto en el consumo de combustibles fósiles, gas y electricidad liberando CO₂ hacia la atmósfera y aumentando la huella de carbono.

Las emisiones de vapor y partículas contaminantes expulsadas hacia la atmósfera son precisamente por las plantas y equipos de la fábrica, liberando óxidos de nitrógeno (NO_x), óxido de azufre (SO_x) y sulfuro de hidrógeno (H₂S). Así como la liberación de malos olores por presencia de trimetilamina (C₃H₉N), sustancia presente en el proceso de deterioro de los productos pesqueros. El cual en grandes cantidades puede ser una sustancia tóxica. Según lo reportado por SINIA (2011) se calculó la liberación de cerca de 150 kg/día de trimetilamina por tonelada de harina de pescado producida por día, así como el cálculo de emisiones de CO (monóxido de carbono) en las plantas de producción de harina de pescado en Perú, y se estimó en 10.0 ton/año por cada tonelada de harina de pescado elaborada.

Además de la generación de gases contaminantes, el uso de grandes cantidades de agua limpia para el lavado de la materia cruda congelada, en el proceso de cocción, centrifugación y limpieza de los equipos provoca un derrame de aguas contaminadas vertidas a los alcantarillados que desembocan en ríos y llegan a las bocas del océano (FAO, 1986). Lo anterior da lugar a que se genere un impacto ambiental significativo, deteriorando la flora, fauna y sedimentos, alterando el nicho ecológico marino, propiciando la eutrofización de bahías y zonas costeras en países como Perú, Chile, China, India, Malasia y otros países asiáticos, quienes son los mayores productores de harina de pescado a nivel mundial (IFFO, 2022; Jave *et al.*, 2020; Jones *et al.*, 2022). Por ende, la perturbación de los ecosistemas ocasiona la pérdida de biodiversidad y alteración de ésta.

Por otro lado, la escasez de recursos marinos también es una de las razones por las que la producción de harina de pescado se ha convertido en un ingrediente de alto valor económico con limitada accesibilidad para la alimentación acuícola. Especies como la anchoveta, sardinas, bacaladilla, anguila, arenque, entre otros, han sido, históricamente poco atractivas para consumo humano, por lo que son destinadas a la producción de harina y aceite.

Por otro lado, la gran demanda de peces utilizados para la elaboración de harina ha ejercido presión en sobrepesca en las últimas décadas. Tan solo la producción mundial de la pesca de captura en 2020 fue de 90.3 millones de toneladas equivalentes al 51% de total de producción de animales acuáticos y de ellas se utilizó el 81% a la producción de harina y aceite (IFFO, 2022). Además de la utilización de peces de captura, el uso de subproductos de pesquerías ha tomado lugar dentro de la producción de harina (Egerton *et al.*, 2020). Sin embargo, esto no es suficiente para el abastecimiento de la demanda de harina de pescado, por tanto, ha resultado ser un ingrediente insostenible dentro de la acuicultura.

El minimizar la dependencia de la harina de pescado en los sistemas productivos tanto de peces como del camarón blanco (*L. vannamei*) ha tomado muchas líneas de investigación, con el objetivo de identificar cuáles son las mejores fuentes de proteína que el camarón requiere para su crecimiento y así cumplir las demandas de mercado.

3. Uso de alimentos sostenibles en reemplazo de la harina de pescado

En los últimos años la búsqueda de fuentes alternativas a la harina de pescado debe cumplir ciertos criterios nutricionales, como ser de buena calidad proteica, contener un aceptable perfil de aminoácidos y ácidos grasos, poseer alta digestibilidad y una óptima palatabilidad. A la par, tener una disponibilidad y producción sostenible y de bajo precio, que permita sustituir a la harina de pescado en la alimentación del camarón, al igual que otras especies.

Las fuentes proteicas de origen animal y vegetal han tomado, un interés importante en la inclusión dentro de la formulación de dietas para camarón y especies acuícolas en general. Por ende, el uso de la harina de trigo, maíz, soya, entre otras se presentan como una opción adecuada para su utilización, y por tener un precio accesible para su adquisición. Sin embargo, entre éstas, es necesario que contengan un alto contenido en proteína para poder sustituir a la harina de pescado, por lo que no muchas fuentes vegetales han logrado hacerlo. De hecho, la soya es una de las pocas fuentes de proteína vegetal que se encuentra en una alta concentración sin tener que contar con un aislado de la misma. En decir, un proceso de extracción y aislamiento de la proteína. Además de lo anterior, se ha demostrado que las fuentes de proteína vegetal son deficientes en aminoácidos esenciales como metionina, lisina

y cisteína. (Hua *et al.*, 2019; Sánchez-Muros *et al.*, 2020) lo que las hace tener una menor digestibilidad. Cho & Kim, (2011) reportaron que la harina de soya (HS) posee tan solo 47.5% de proteína, mientras que la harina de canola (HC) contiene 35.6% y la harina de linaza (HL) se muestra con 33.6% de proteína, en comparación con 64.6% de proteína de la harina de pescado (HP). Así mismo, muestra que la HS contiene tan solo 1.41g/100gPC (proteína cruda) de metionina en comparación con 3.02g/100g PC de harina de pescado. Por lo que su sustitución solo puede llegar hasta un 20% en dietas para camarón evitando así un descenso en su crecimiento, en caso contrario el aporte superior del 20% puede afectar su rendimiento productivo. Además, el consumo en exceso de la harina de soya produce enteritis provocando la muerte de las especies comerciales (Fuentes *et al.*, 2018; Hua *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2015).

Por otro lado, las proteínas de origen animal provienen de los subproductos derivados de la industria del procesamiento de carnes de animales terrestres. Como resultado de su producción, se elabora harina de despojos de ave de corral, bovino y cerdos, además de sangre y hueso. Estas harinas muestran ser superior en el porcentaje de proteína en comparación con las harinas vegetales, además de que gracias a su perfil de aminoácidos presentan una mejor digestibilidad y son de bajo precio en comparación a la harina de pescado (López-Ortiz *et al.*, 2023). Debido a las ventajas nutricionales de la harina de subproductos de ave, no se descarta la posibilidad de que este ingrediente puede entrar en competencia adquisitiva a largo plazo, por ser utilizado para consumo pecuario y generaría el problema en que la harina de pescado se encuentra actualmente.

Otras alternativas de proteína están relacionadas con los sistemas de biofloc (BT), integradas por bacterias, hongos y partículas de materia orgánica e inorgánica que aporta nutrientes al camarón y siempre están disponibles en los sistemas de cultivo. Además, de minimizar el uso de agua y suelo y prevenir enfermedades a la especie, el mal manejo de estos cultivos microbianos puede generar inestabilidad en la calidad de agua al producir un exceso de sólidos suspendidos, acidez y contaminación por nitrificación, sin contemplar el gasto de energía generado por la aireación y mezcla continua de los flóculos (Fattah & El-Sayed, 2020; Sánchez -Muros *et al.*, 2020). También el uso de algas marinas son una opción de reciente investigación en el que se ha demostrado que son ricos en polisacáridos sin

almidón, vitaminas y minerales además de mejorar el crecimiento y respuesta inmune. Sin embargo, Rodríguez-González *et al.* (2014) reportaron que al tener una inclusión de hasta 15% de harina de *Ulva Lactuca* hubo menor crecimiento en el camarón *L. vannamei* debido a las deficiencias en la composición de aminoácidos. De la misma manera el uso de proteínas de levadura es considerado como un recurso sustituto de la harina de pescado al poseer altos niveles de proteína cruda (62.95%). No obstante Zhao *et al.* (2017) demostraron que hasta un 45% de harina de pescado puede ser reemplazada por extracto de levadura, siempre y cuando se agregue aceite de pescado, fósforo y calcio como suplementos, de lo contrario habría pérdida de nutrientes solubles en agua y generaría una disminución en actividades enzimáticas como la lipasa. Cabe destacar que el aceite de pescado también es un recurso limitante en la alimentación acuícola.

3.1. Harina de insectos como alternativa proteica en el crecimiento y supervivencia del camarón

Otra de las alternativas potenciales es el uso de harina de insectos como reemplazo proteico en la alimentación del camarón. Además, de contribuir con la nutrición del camarón, los insectos en general no compiten por espacio para su producción con las fuentes tradicionales de alimentación. Por otro lado, tampoco presentan competencias en alimentación para consumo humano. Al mismo tiempo los insectos son una vía de transformación y conversión alimenticia eficiente sobre desechos vegetales que produce la agricultura y actividades domésticas. Cabe mencionar que los insectos tienen ciclos de vida cortos, con altas tasas de reproducción, y a nivel productivo no requieren de áreas superficiales extensas. Además, su consumo de agua es mínimo y su gasto energético menor. Representan una fuente de nutrientes con alto contenido de proteínas, cantidades representativas de lípidos, ácidos grasos, minerales y vitaminas (Da Silva Lucas *et al.*, 2020; Hua *et al.*, 2019) Existen diversas especies de insectos que son óptimas para la inclusión en dietas del camarón *L. vannamei*. Entre ellas, se encuentran especies como: *Tenebrio molitor* (gusano de la harina), *Macrotermes* (termitas), *Hermetia illucens* (mosca soldado-negra), *Acheta domesticus* (grillo domestico), entre otras. Organismos que son consumidos en distintos estadios ya sean en etapa larval, pupas o adultos. Se ha demostrado que, *H. illucens*

presenta hasta un 70% de proteína, superando a *Tenebrio molitor* con 65.5% de proteína y 28.2% de lípidos; mientras que *Gryllus bimaculatus* tiene hasta 57% de proteína y 25% de lípidos (Da Silva Lucas *et al.*, 2020; Peh *et al.*, 2021; Richardson *et al.*, 2021). Así como el grillo común originario de México (*Acheta domesticus*) como se mencionará a continuación.

3.2. Características nutricionales de *Acheta domesticus* como alternativa nutricional en la producción de camarón

La utilización de *Acheta domesticus* es una opción factible en dietas para camarón ya que es considerado como un vector no patógeno, pero considerado en América latina como una plaga ocasional. No obstante, posee alto valor nutricional, al contener hasta un 64.4% de proteína y 18.5% de lípidos. La harina es rica en aminoácidos esenciales como lisina con 51.1g/100gPC, metionina al contener 14.6g/100gPC y arginina que dispone de 6.71g/100gPC, permitiendo su inclusión en dietas para camarón (Da Silva Lucas *et al.*, 2020; Van Huis *et al.*, 2013). Peh *et al.* (2021) evidenciaron que al incluir 50% de harina *Gryllus bimaculatus*, conocida como grillo negro o de dos manchas, se obtuvo una tasa de conversión alimenticia de 1.83% y dar lugar a una supervivencia del 88.3% en camarón, comparada con harina de pescado y 0% de inclusión de grillo. Es interesante resaltar que esta especie de grillo pertenece al mismo orden que *A. domesticus* utilizado en el presente trabajo. En otra investigación mencionan que la ingesta del 10% de grillo seco negro (*G. bimaculatus*) en dietas de *L. vannamei* se obtuvo el 79.1% de digestibilidad aparente en materia seca, con tasa de crecimiento específica del 6.32%/ día y supervivencias de 87.8% en sistema experimental de 65 días (Shin & Lee, 2021).

El grillo *Acheta domesticus* ha sido un alimento consumido desde la época prehispánica, principalmente en estados del centro y sur de México tales como Oaxaca, Hidalgo y Tabasco y países asiáticos como Tailandia esto por su valor cultural, por ello ha formado parte de la cocina tradicional como sustituto de carne en comunidades rurales. Actualmente su consumo en la sociedad ha sido solo un consumo de manera exótica o como suplemento alimenticio o bocadillos (Acosta-Moreno *et al.*, 2019; FAO, 2021; García *et al.*, 2022; Ho *et al.*, 2022; Van Huis *et al.*, 2013). Igual *et al.* (2020) evaluaron la inclusión del

7.5% de la mezcla de grillo seco común (*A. domesticus*) para aumentar el 9.7% de proteína y valor energético en aperitivos extruidos bajos en grasa y manteniendo su textura crujiente.

Por otro lado, ya existe información sobre su uso como fuente proteica en crecimiento de Gar tropical (*Atractosteus tropicus*) o en rendimiento productivo y pigmentación de guppy (*Poecilia reticulata*) (Perera & Bhujel, 2022). Por ende, es una especie prometedora que podría favorecer su implementación en la alimentación para camarón. Sin embargo, su alto contenido de quitina podría ser una limitante en su utilización en dietas para algunas especies de peces como la *perca fluviatilis* al sustituir 25% de grillo seco (*A. domesticus*), disminuyendo su crecimiento con respecto a la harina de pescado, esto reportado por Tilami *et al.* (2020).

La elaboración de harina de insectos también se requiere de gastos en energía para el secado, molienda y almacenamiento. Por tanto, puede provocar problemas de absorción de humedad y generar la oxidación lipídica, provocando rancidez y pérdida en su calidad nutricional. Por ello la implementación de un proceso de conservación con la utilización de ácidos podría ser conveniente para la reducción de la huella de carbono. Proceso denominado ensilaje o hidrolizado en ácido, aplicado generalmente para los productos pesqueros. En este caso, sería también factible implementarlo al grillo común (*A. domesticus*). Resultando en, un proceso que contrarreste el gasto de energía ejercida en los hornos de secado cuyo fin es disminuir la huella de carbono, y minimizar los problemas ambientales que ocasiona la industria harinera de pescado.

Este método de conservación ácido anaeróbico controlado con un pH menor a 5, es propiciado con la ayuda de ciertas enzimas proteolíticas que puedan facilitar la disponibilidad de las proteínas, ácidos grasos y aminoácidos presentes en el grillo. Y así, dar lugar a que el camarón pueda digerir y absorber eficientemente los nutrientes. Otro beneficio de los hidrolizados en ácido está relacionado con su actividad antioxidante, ya que al aumentar la capacidad de donación de electrones y protones en los péptidos disponibles permite eliminar los radicales libres presentes en los camarones sometidos a estrés oxidativo (Da Rocha *et al.*, 2018).

Los ensilajes en ácido con rangos de pH óptimo se encuentran de 2.5 a 5, esto permite una estabilidad en la conservación a nivel molecular. A nivel productivo se evita el crecimiento bacteriano y puede ser almacenado a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo (Backhoff, 1976; Hleap & Gutiérrez, 2017; Stephenson & Smedbol, 2001). De manera natural estos ensilajes cuando se aplican a los subproductos pesqueros dan lugar a un proceso de autólisis. Es decir, gracias al bajo pH de conservación propicia la actividad de las enzimas digestivas como la pepsina para la hidrólisis. El proceso de ensilar o conservar un producto con ácidos, reduce considerablemente la huella de carbono, al disminuir el gasto energético por elaboración y almacenamiento de la materia prima, además de evitar la contaminación del ecosistema marino.

3.3. Quitina y su efecto en el sistema inmune

Se cree que el uso de los insectos en las dietas para camarón puede afectar la digestibilidad y reducir su crecimiento, debido a la quitina que forma la cutícula del exoesqueleto en los insectos. Sin embargo, el camarón blanco posee ciertas enzimas digestivas (quitinasa, quitobiosa y lisozimas) que logran degradar a este carbohidrato (Fines & Holt, 2010). Esto se ha comprobado en bioensayos donde el suministrar un 5% de quitina, mejoró el crecimiento en camarones *P. monodon* (Shiau & Yu, 1998). E incluso en peces se ha reportado que el incluir el 10% en alimento para anguila japonesa (*Anguilla japonica*), besugo del mar rojo (*Pagrus major*) y pez rey de cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*) tuvieron un óptimo crecimiento (Kono *et al.*, 1987). Con esto se demuestra la capacidad que tienen las enzimas para desnaturalizar, degradar y asimilar las especies marinas sobre la quitina.

Además, la quitina es considerada como un material bioactivo, ya que, al interactuar con tejidos funcionales adyacentes, disminuye las respuestas inflamatorias. Por tanto, la quitina se aplica como un agente antimicrobiano, analgésico y antioxidantes. Peh *et al.* (2021) observaron un efecto inmune contra *Vibrio alginolyticus* al suministrar una dieta con 7.15% de quitina en dietas para camarón en donde se observó la estimulación de péptidos antimicrobianos (AMP) y respuestas antioxidantes.

Los beneficios de la quitina ha sido posible observarlos con el aumento o disminución del grado de desacetilación de la misma, es decir, la cantidad total de grupos acetamida convertidos en amina, e identificar sus propiedades como solubilidad, pH, absorción, entre otros, logrando observar una disminución o aumento de respuestas inflamatorias en las células (Al-Rooqi *et al.*, 2022; Shigemasa & Minami, 1996; Shin & Lee, 2021).

3.4. Inducción del sistema inmune bajo estrés

La existencia de factores estresantes crónicos o agudos en los sistemas de cultivo, así como cambios ambientales, salinidad, hipoxia, calidad de agua, patógenos, entre otros (Martínez-Antonio *et al.*, 2019), afectan el crecimiento y supervivencia de los camarones. Por ende, el suministro de alimentos sostenibles como fuente de proteína principalmente de insectos podrían propiciar la producción de metabolitos y proteínas plasmáticas y celulares. Respuestas que podrían ser medibles a través del nivel de colesterol, triglicéridos, proteínas totales, glucosa, HSP 70, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa que fungen como antioxidantes celulares (Mercier *et al.*, 2006). Es así como, los convierte en indicadores fisiológicos y moleculares para evaluar el sistema inmune en la hemolinfa y hepatopáncreas de los peneidos en respuesta al estrés oxidativo al que están sometidos. A través de esta investigación se ofrece al grillo *A. domesticus* en EAHG como alimento proteico para analizar su efecto y los componentes nutricionales que pudiera proveer en el camarón (*L. vannamei*), en función de la digestibilidad, índice productivo y estado de salud, al ser comparados en dieta de harina de pescado.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del ensilaje ácido hidrolizado de grillo entero en sustitución de la harina de pescado en dietas para el camarón *Litopenaeus vannamei* sobre sus índices productivos.

Objetivos específicos:

- Elaborar el ensilaje ácido hidrolizado de grillo mediante la adición de una mezcla de ácidos cítrico/ fosfórico (2.6% cada uno) añadiendo una proteasa ácida (pepsina de cerdo).
- Evaluar el efecto de sustituir la harina de pescado con ensilaje ácido hidrolizado de grillo (0, 8.2, 16.5, y 24.7% de sustitución) en dieta sobre el crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia del camarón (*L. vannamei*).
- Evaluar el efecto de la inclusión del ensilaje ácido hidrolizado de grillo sobre la digestibilidad de las dietas.
- Evaluar el efecto de la inclusión del ensilaje ácido hidrolizado de grillo sobre la química sanguínea en la hemolinfa (proteína, glucosa, colesterol).
- Cuantificar los niveles de quitina en el ensilaje ácido hidrolizado de grillo.

III. HIPÓTESIS

- La dieta hasta un 25% de nivel de inclusión del ensilaje ácido hidrolizado de grillo resultará en igual o mejor índice productivo, estado de salud y capacidad digestiva del camarón *Litopenaeus vannamei*, que el obtenido con harina de pescado.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Elaboración de ensilaje ácido hidrolizado de grillo

Se utilizó grillo común, *Acheta domesticus* donado amablemente por un productor local de Ensenada BC. De los cuales se molieron 10 kg utilizando un triturador Robot Coupe Model R10® USA Inc. del Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva (laboratorio FEED-AQUA, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), B.C., México) para formar una mezcla homogénea durante cuatro minutos. Siguiendo el procedimiento del laboratorio, una mezcla de 2.6% de ácido fosfórico y cítrico (c/u) se añadió a la masa de grillo mezclando uniformemente por cuatro minutos más (Viana *et al.*, 2007). Con el fin de fomentar la hidrólisis ácida, se agregó 0.5% de pepsina a la mezcla, y se homogeneizaron todos los ingredientes por un periodo de dos minutos. Una vez mezclado, se procedió a tomar 2mL de muestra para medir el pH inicial. A continuación, se vertió la mezcla a un recipiente cilíndrico (cubeta), para impedir la proliferación de microorganismos se cubrió con plástico evitando la formación de burbujas de aire, ya que el ensilaje es un proceso de hidrólisis anaeróbica. Finalmente, la cubeta se cerró herméticamente conservándola dentro de un espacio oscuro a temperatura ambiente.

La supervisión, mezcla y monitoreo del pH en el ensilaje se alternó cada dos días, durante seis semanas, manteniendo un pH menor a 3.5.

Cumpliendo las seis semanas de supervisión establecida, para fin de la presente investigación, el producto se secó en un horno vertical a 40°C durante 48 horas. Después de las seis semanas, y con el objetivo de detener el proceso de hidrólisis, el ensilaje fue secado por completo. El proceso de secado del ensilaje ácido hidrolizado de grillo (EAHG) se llevó a cabo por medio de 11 charolas de aluminio de 100cm x 85cm, con un grosor de 2 cm de muestra y se colocaron en una estufa de convección a 60°C por 48 horas. Después del tiempo establecido de secado, las muestras fueron homogeneizadas, se tomó una muestra representativa para medir la humedad por medio de una termobalanza OHAUS®. Una vez secó el producto (EAHG) se almacenó en refrigeración para su conservación y posteriormente hacer uso en la elaboración de las dietas. El porcentaje de humedad medido fue de 9.94%.

4.2. Elaboración de dietas

Se formularon cuatro dietas isoproteicas (41% PC) e isolipídicas (9.7% GC) con distinto porcentaje de inclusión de ensilaje, basadas en la formulación previamente validada (Cuadro 1) (Amador *et al.*, 2022; Mata-Sotres *et al.*, 2018; Pintor *et al.*, 2022).

Todas las dietas experimentales fueron elaborados conforme a los protocolos internos del Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva (laboratorio FEED-AQUA, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), B.C., México).

La formulación se basó en cuatro niveles de sustitución de la harina de pescado por EAHG. Con el fin de llegar a una dieta final sin harina ni aceite de pescado (libre de pescado). La harina de pescado y aceite de pescado se disminuyeron paulatinamente conforme se agregó la ensilaje de grillo seco. Con el fin de compensar los niveles de grasa en el EAHG se utilizó canola para compensar el faltante del aceite de pescado para topar los requerimientos de a especie.

Los macroingredientes fueron pulverizados, tamizados y mezclados en el cortador/mezclador vertical hasta formar una masa homogénea. A continuación, los micronutrientes se incorporaron a la mezcla de macronutrientes. Después se integró la fécula de maíz, la gelatina, el aceite de pescado y el aceite de canola respectivamente y conforme a la formulación establecida, hasta formar la textura deseada. Las dietas se pasaron por el extrusor en frío (Rosito Bisani ®) para formar tiras de alimento compactado. Se cortaron en el procesador de alimentos para obtener pellets de 2mm. Finalmente, el alimento se secó en estufa de aire forzado a 60°C por 24 horas para obtener una humedad menor de 10%.

Para calcular el contenido de proteína cruda para la formulación de las dietas, se consideró el nitrógeno total estimado incluyendo la quitina de grillo. De esta manera, la proteína de grillo se calculó con un factor de 4.76 esto de acuerdo con Janssen *et al.* (2017), en lugar de 6.25 el factor estándar aplicado en alimentos.

Cuadro 1. Formulación teórica de cuatro dietas experimentales con inclusión de ensilaje ácido hidrolizado de grillo con diferente porcentaje de inclusión.

Ingredientes	Tratamientos			
	Control	Bajo	Medio	Alto
	%	%	%	%
Harina de pescado ^a	15.50	10.35	5.18	0.00
Harina de ave ^b	9.00	9.10	9.20	9.30
Ensilaje de grillo ^c	0.00	8.20	16.50	24.70
Proplex T ^d	6.00	6.00	6.00	6.00
Soya 65% ^e	7.00	7.00	7.00	7.00
Harina blanca de trigo ^f	20.19	17.00	14.14	11.67
Gelatina ^g	8.00	8.00	8.00	8.00
Gluten de maíz ^h	5.00	5.00	5.00	5.00
Aceite de pescado ⁱ	4.90	1.82	0.00	0.00
Aceite de canola ^j	0.00	2.42	3.57	2.92
Maicena ^k	19.70	19.70	19.70	19.70
Metionina ^l	1.00	1.00	1.00	1.00
Rovimix (mezcla vit y min) ^m	2.50	2.50	2.50	2.50
Stay c ^m	0.10	0.10	0.10	0.10
Fosfolípidos ^l	1.00	1.00	1.00	1.00
Nature-DHA (17%) ⁿ	0.00	0.70	1.00	1.00
Benzoato de sodio ^l	0.10	0.10	0.10	0.10
BHT ^o	0.01	0.01	0.01	0.01
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

Las dietas contienen 0, 8.2, 16.5 y 24.7% de inclusión de ensilaje ácido hidrolizado de grillo (EAHG), denominadas dieta control (D-Control, dieta bajo (D-Bajo), dieta medio (D-Medio) y dieta alto (D-Alto).

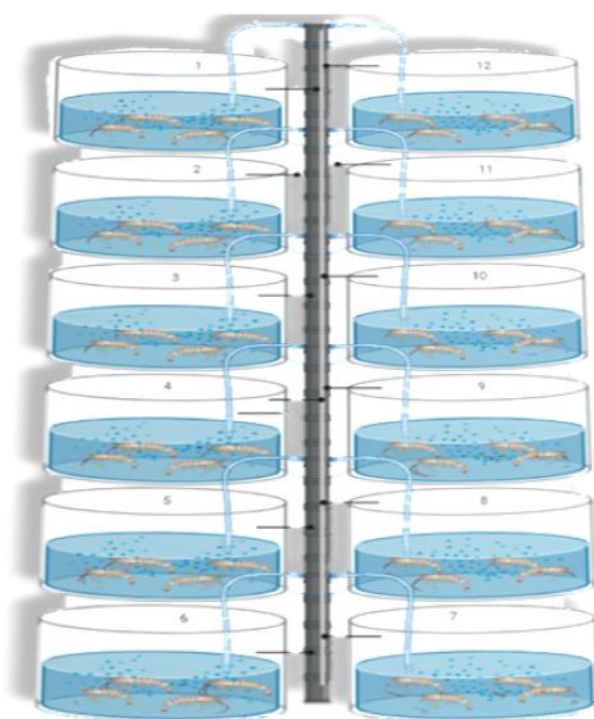
Proveedor ingredientes: (a) Procesador del mar de Ensenada S de R. L. de CV. Scoular de México S. de R.L. de C.V. (b). Producción local por pedido (c). ADM México^(d). COLPAC (e). Molinera del Valle (f). Progel Mexicana S.A. de C.V., León, Guanajuato, México (g). INGREDION México S.A. de C.V. (h). Scoular USA⁽ⁱ⁾. GRANOS Y SEMILLAS SAN MIGUEL^(j). INGREDION México S.A. de C.V. (k). FUTURE FOODS^(l). DSM Nutritional Products México, S.A. de C.V. (m). ADM México⁽ⁿ⁾. Future Foods^(o).

4.3. Bioensayo y aporte de alimentación

El bioensayo se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC), en la “plataforma de cultivo” y con duración de 64 días de experimentación. Se prepararon 12 estanques con 500 L (espacio útil) cada uno (Figura 1), conectados a un sistema de recirculación con un biofiltro. Se utilizaron piedras de aireación en cada estanque. 15

organismos fueron distribuidos al azar en cada uno de los estanques, con un peso promedio individual de 4.3 g. Las dietas de los cuatro tratamientos se asignaron aleatoriamente por triplicado (4 x 3) para ser alimentados cuatro veces al día (8:00, 11:00, 14:00, 17:00 horas). En un principio se calculó una tasa de alimentación del 10% de su peso diario como ración. Sin embargo, con el fin de llegar a la saciedad, diariamente se observó que dejaban restos de alimento por lo que se fue ajustando la ración alimenticia.

Los parámetros de oxígeno, salinidad y temperatura fueron registrados dos veces a la semana utilizando un oxímetro (YSI-55, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA) (Figura 2). El monitoreo de calidad de agua (nitratos, nitritos y amonio) se realizó una vez por semana con Kits colorimétricos API test kits® (Mars Fishcare Inc., Chalfont, PA, USA). La temperatura promedio se mantuvo a 28.2°C, la salinidad a 34 ppm y el nivel de oxígeno a 6 mgL⁻¹.



*Figura 1. Sistema experimental de 12 estanques para bioensayo de los camarones blanco del Pacífico *L. vannamei*.*

La distribución de las dietas (Cuadro 2) se proporcionó aleatoriamente en los 12 estanques experimentales, con base en la tabla de alimentación de Fox *et al.* (2012) y el peso promedio inicial (4.3 g) de los organismos se utilizó para el estimado de cantidad total en alimento por día a proporcionar, el cual se dividió en cuatro raciones con distinto horario de alimentación.

Cuadro 2. Distribución de dietas experimentales en sistema experimental de camarones L. vannamei.

Tratamientos	Estanques		
Control (0%)	1	5	11
Bajo (8.2%)	3	8	10
Medio (16.5%)	2	6	12
Alto (24.7%)	4	7	9



Figura 2. Equipo y kits de monitoreo de parámetros de salinidad, temperatura y calidad de agua.

4.4. Análisis químicos proximales

Todas las dietas experimentales, ensilaje ácido hidrolizado de grillo (EAHG), tejidos (músculo y hepatopáncreas) y heces se analizaron por triplicado para determinar su composición proximal química, por los siguientes métodos.

a) Estimación de la humedad

Para determinar el porcentaje de humedad se utilizaron 2 g de muestra molida. Las muestras se colocaron en charolas de aluminio previamente pesadas, y se secaron en una estufa a 60°C hasta obtener un peso constante. Después de 24 horas las muestras se pesaron para calcular el porcentaje de humedad a través de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso muestra inicial} - \text{Peso muestra final}}{\text{Peso muestra inicial}} * 100$$

b. Estimación de las Cenizas

Se calculó gravimétricamente el porcentaje (%) de cenizas. Para ello, se utilizaron crisoles de porcelana calcinados y pesados previamente. Se colocaron 2 g de muestra seca por triplicado, seguidamente se ingresaron a una mufla con una temperatura de 550°C por cuatro horas. Pasado el tiempo de calcinación, se dejó enfriar para después ser pesados y obtener su porcentaje de ceniza mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Diferencia} = \text{Peso inicial (crisol + muestra)} - \text{Peso final (crisol + muestra)}$$

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{Diferencia} * 100}{\text{Peso inicial de muestra}}$$

c. Estimación de la proteína cruda

La obtención del porcentaje (%) de proteína cruda (PC) se analizó bajo el método Micro-Kjeldahl (KJELDATHERM® / VAPODEST®) siguiendo el protocolo del equipo. En resumen, se agregó la muestra a un catalizador y antiespumante, y se agregaron los siguientes reactivos: 4.875 g de sulfato de potasio (K_2SO_4), 0.075 g de sulfato cúprico (CuSO_4). Después, se agregó 1 g de muestra envuelta sobre papel KIPWIPES® y se pusieron dentro de los tubos VEPLScientific® por triplicado para ser llevados al digestor. Para la digestión se agregaron 12 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), y se mantuvieron a 420°C por un periodo de 90 minutos.

Después de la digestión, la muestra se dejó enfriar y a continuación se aforó con agua destilada sobre matraces de aforación de 50 mL, que posteriormente fueron almacenadas en tubos falcón para su conservación.

Después de la destilación se atrapó el nitrógeno libre por medio de ácido bórico en un vaso de precipitado. A continuación, se tituló con ácido clorhídrico (HCl) y se calcularon los moles de nitrógeno (N) por el factor de conversión 6.25 estándar para alimentos. Las muestras finales fueron tituladas usando el colorante (azul de metilo con rojo de metilo) de viraje a pH 7 (AOAC, 2015; Araújo *et al.*, 2020). Es importante mencionar que, para no sobreestimar el porcentaje de proteína disponible en las dietas con ensilaje ácido hidrolizado de grillo (EAHG), se hizo un ajuste para el contenido de nitrógeno no proteico (NNP) de las mismas por lo que se multiplicó por el factor de 4.76 en lugar de 6.25 de acuerdo con Janssen *et al.* (2017). Este ajuste se realiza de acuerdo con el contenido de nitrógeno no proteico presente en la quitina de los insectos y en particular el grillo doméstico. Dichos autores establecen un ajuste por distintos factores de conversión dependiendo del tipo de insecto de acuerdo con el contenido de quitina en su cutícula (exoesqueleto).

d. Estimación de los grasa cruda

La extracción de grasa cruda (GC) se realizó siguiendo el método Soxhlet, usando 2 g de muestra seca dentro de cartuchos de papel filtro Whatman®. Se colocaron en tubos de sifón para la extracción, mientras que en un matraz de destilación previamente pesado y rotulado se agregaron 100 mL de éter de petróleo (solvente que es utilizado para la extracción de compuestos no volátiles, de baja solubilidad), por un lapso de 4 horas. Una vez terminado el proceso de extracción, el matraz con el contenido lipídico se colocó en el desecador por 24 horas para evaporar el resto del solvente, finalmente se pesó el matraz con la muestra para obtener el porcentaje (%) de grasa cruda por diferencia (AOAC, 2015).

4.5. Índices productivos

Crecimiento y desempeño

El bioensayo experimental tuvo una duración de 8 semanas (64 días), donde se realizó el conteo y pesaje individual final de camarones de cada unidad experimental (estanques). Entre ellos, tres organismos por estanque se sacrificaron por hipotermia, de acuerdo con el protocolo de manejo para evitar estrés oxidativo y extraer muestras de tejido (músculo y hepatopáncreas) y hemolinfa para evaluar los siguientes parámetros productivos:

Índice hepatosomático (HSI):

$$HSI = \frac{\text{Peso hepatoáncreas}}{\text{Peso biomasa individual}} * 100$$

Tasa de crecimiento específico (SGR):

$$SGR = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso inicial}}{\text{Días totales}} * 100$$

Ganancia de peso (g) (GP):

$$GP = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

Ganancia total de peso en porcentaje (%GP):

$$\% GPx = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Tasa de Conversión alimenticia (TCA):

$$TCA = \frac{\text{Consumo de alimento}}{\text{Ganancia de peso}}$$

Consumo de alimento (CA):

$$CA = \frac{100 * (\text{Consumo de alimento} / ((\text{Peso inicial} + \text{Peso final})/2))}{\text{Días totales}}$$

Coefficiente de crecimiento térmico (TGC):

$$TGC = \frac{1000 * ((\text{Peso final } 1^3 - \text{Peso inicial } 1^3))}{\Sigma(\text{Días} * ^\circ C)}$$

4.6. Determinación del contenido de ácidos grasos

Para identificar el perfil de ácidos grasos se utilizaron muestras de tejido (músculo y hepatopáncreas), así como muestras de EAHG y de las dietas previamente secadas a 60°C hasta peso constante. Se siguió el método descrito por Parrish *et al.* (2015), donde 1 g de

muestra seca se pescó en un vial. Se agregó 3 mL de solución de metileno (10:1:1; Metanol: diclorometano: HCl). Se homogeneizó en vortex por 2 minutos. Posteriormente se agregó nitrógeno y se cubrió con parafilm, para evitar pérdida de muestra durante el baño María sometido a 85°C durante 2 horas. Pasado el tiempo se dejó enfriar (15 minutos aprox.). Se agregó 1.5 mL de agua destilada y 1.8 mL de solución de extracción (4:1, Hexano: diclorometano). Se centrifugó por 15 minutos con 4°C a 289 rcf (fuerza centrífuga relativa, por sus siglas en inglés). Finalmente se retiró el sobrenadante y se almacenó en viales ámbar con gas de nitrógeno.

- a) Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) de las muestras se analizaron por cromatografía de gases equipada con detector de ionización de llama (Agilent GC 6880, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) usando nitrógeno como gas portador. Donde las condiciones de la columna GC (60 m x 0.25 mm con un grosor de película de 0.25 μm ; Agilent 122-2362 dB-23) fueron: Temperatura inicial del horno de 50°C durante 1 min, de 50 a 140°C a 30 min^{-1} , mantenida a 140°C durante 5 min, de 140°C a 240°C por 4 min^{-1} , y finalmente 240°C durante 20 min.
- b) Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 230°C y 260°C, respectivamente.

Los FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos) se identificaron comparando los tiempos de retención de diferentes estándares (37 Component FAME mix, PUFA 1 y PUFA 3, Supelco/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ya que no se cuantificaron los otros componentes lipídicos separados por saponificación, los ácidos grasos se reportan en porcentaje total de los ácidos grasos identificados.

4.7. Digestibilidad aparente en materia seca

Para obtener la digestibilidad aparente en materia seca en los camarones alimentados con las distintas dietas, se utilizó el método de cenizas insolubles en ácido como marcador interno (Montaño-Vargas *et al.*, 2002). Las cenizas insolubles en ácido corresponden al silicio que es un mineral no absorbible, cuyo fin es cuantificar el contenido total de silicio entre las heces y alimento y así calcular el total de materia seca absorbida por el camarón.

Las muestras de heces y dietas fueron calcinadas dentro de una mufla a 550° C durante 6 horas. A continuación, se pesaron en papel encerado y colocadas en un vaso de precipitado previamente rotulado. Se agregó 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 2N a las respectivas muestras, se taparon con vidrio de reloj para evitar evaporación y se colocó en la plancha de calentamiento a 100°C hasta llegar al punto de ebullición. Posteriormente se dejó enfriar y se procedió a filtrar las muestras en papel filtro Whatman® de fibra de vidrio GF-F de 47 mm de diámetro en matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. Se realizaron enjuagues con agua destilada caliente (las necesarias) y se guardaron en sobres de aluminio (marcados y pesados con anterioridad). Finalmente fueron calcinadas nuevamente en mufla a 550°C por 6 horas, se pesó y se calculó gravimétricamente.

4.8. Perfil de aminoácidos

Para la estimación del perfil de aminoácidos en las dietas y organismos se requirió de varios procedimientos, brevemente detallados:

a) Hidrólisis de proteína

A una muestra de 20 mg desengrasada, se puso en un vial y se agregó 1 mL de solución HCl 6N/Fenol 0.1% y se homogeneizó en vortex por 2 minutos, después se secaron las muestras utilizando gas nitrógeno (N²) para evitar su descomposición. Se cubrieron con empaque teflón y tapa. Se incubaron a 110°C por 24 horas. Finalmente se dejó enfriar.

b) Preparación de muestra hidrolizada para HPLC

Una vez fría la muestra, se vertió a un matraz de aforado de 25 mL, simultáneamente se enjuagó el vial de muestra con agua grado HPLC (agua desionizada) para retirar toda la muestra posible y vaciar el contenido sobre el matraz de aforado, continuamente se homogeneizó y se aforó la muestra con agua grado HPLC, se almacenó en tubos falcón de 50 mL. Posteriormente se filtró 1.5 mL de muestra en viales ámbar etiquetados, usando filtros de disco de 0.2µm para jeringa. Por último, se agregó gas nitrógeno (N²), se tapó y se guardó en refrigeración hasta la inyección en equipo HPLC siguiendo el método Schuster, (1988) con FMOC/OPA como posderivatizador.

Las soluciones de arrastre para el HPLC se filtraron previamente. Para la fase polar se filtró un volumen de 1L con 40nm de buffer de fosfato de monosódico (NaH₂PO₄) con pH

de 7.5 y 1 L de agua grado HPLC de manera independiente. Para la fase no polar se preparó y filtró 1 L agua de acetonitrilo metanol (ACN: MeOH: H₂O) a un volumen de 45:45:10

c) Inyección en el HPLC

Se prepararon 4 viales de reactivos derivatizantes, los cuales incluyen: 100 µL de buffer de borato con solución de 0.4 N en agua de pH 10.2, 100µL de reactivo FMOC, 100 µL de reactivo OPA y 100 µL de agua grado HPLC. Además de 4 diluciones de AA estándar de 250 pmol/µL, 10 x 1 mL, en distintas proporciones: 1, 1:10, 1:2 y 1:5 (µL AA estándar: µL agua HPLC). Finalmente se procedió a inyectar la muestra siguiendo el protocolo de Agilent Technologies y usando equipo HPLC Agilent 1260 Infinity Series ® con una columna Zorbax eclipse AA, 4.6 X 150 mm y 3.5 µm de poro, con un lapso de análisis de 1 hora por muestra.

Debido al exceso de nitrógeno no proteico los aminoácidos se reportan en porcentaje del total identificado utilizando los estándares con tres concentraciones distintas.

4.9. Análisis de la hemolinfa

Parámetros bioquímicos en hemolinfa

De las muestras de hemolinfa del muestreo final, se analizó la proteína total usando el kit Valtek diagnostics®, Santiago de Chile y se midió a 540 nm. Para la obtención de curva estándar se utilizó albumina sérica bovina (BSA) y la proteína se total se reportó como proteína equivalente a BSA. Para el análisis de glucosa total se cuantificó a través del kit (Valtek diagnostics®, Santiago de Chile) en el cual la glucosa es oxidada a ácido glucónico y el peróxido de hidrógeno es oxidado por la glucosa oxidada. Posteriormente el peróxido de hidrógeno reacciona con ácido p-hidroxibenzoico y 4-amino-antipirina en presencia de peroxidasa, donde el producto final coloreado se midió por espectrofotometría a 505nm. Finalmente, para el análisis de colesterol se utilizó un método enzimático en el que el colesterol esterasa hidroliza al colesterol y el colesterol libre es oxidado por el colesterol oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno que se cuantificó por un sistema cromogénico que contiene ácido p-hidroxidobenzoico y 4-amino-antipirina en presencia de peroxidasa y

ser medido a 505 nm. Todo lo anterior bajo los protocolos de Del Rio-Zaragoza *et al.* (2021) y Pintor *et al.* (2022).

4.10. Cuantificación de quitina

Con la finalidad de cuantificar el contenido de nitrógeno no proteico (NNP), se procedió a extraer y determinar el contenido de quitina en el ensilaje ácido hidrolizado de grillo vs el grillo completo (peso seco). Método que se basa en una extracción detergente-ácido (Kandile *et al.*, 2018), basado en la desmineralización y desproteización de la muestra para finalmente determinar por diferencia en peso el contenido de quitina. Finalmente, a través del método de Kjeldahl se determinó el contenido de nitrógeno no proteico.

a) Desproteización

Para la cuantificación de quitina primero se realizó una desproteización, para lo cual se utilizó una muestra seca de 3 g, la cual se agregó a 24 mL de NaOH (1.25N; 1g:8mL) sobre una plancha de calentamiento a una temperatura de 70°C por 4 horas. Los vasos de precipitado con muestra fueron tapados con vidrio de reloj. Pasado el tiempo establecido se dejó enfriar y se centrifugó (Allegra TM 25R Centrifuge con rotor TA 14-500) en tubos nalgene de fondo cónico (50 mL) de 8 espacios, a 12, 209 rcf por 15 minutos a 19°C. Enseguida se decantó el sobrenadante y se agregaron 24 mL de agua destilada caliente a la muestra para centrifugar nuevamente. La finalidad del agua destilada caliente es realizar un lavado a las muestras y extraer la solución de NaOH. Finalmente, con una micropipeta de 1000 µL y puntas de 200 µL se retiró el sobrenadante cuidadosamente para evitar pérdida de muestra.

b) Desmineralización:

A la muestra se le agregaron 30 mL de HCl a 0.32N (1:10 mL), y se dejó reposar en los tubos nalgene de fondo cónico por 24 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se realizó el centrifugado a 12, 209 rcf por 15 minutos a 19°C. Se decantó el sobrenadante, se agregó agua destilada caliente para los lavados y nuevamente se centrifugó. Para la extracción del sobrenadante se utilizó una micropipeta de 1000 µL y puntas de 200 µL. Por

último, el sedimento de las muestras se vació en charolas de aluminio previamente marcadas y taradas. Las cuales se llevaron al desecador por 24 horas a 60°C, para eliminar la humedad de la muestra, de esta manera se calculó los gramos totales de quitina extraída del ensilaje.

c) Cuantificación de nitrógeno de quitina extraída.

Una vez obtenida la quitina de las muestras se procedió a cuantificar el nitrógeno bajo el método Micro Kjeldahl, como se mostró anteriormente (pág. 19).

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis de normalidad y homogeneidad de las varianzas se verificaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Así mismo se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y donde se observó diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizó una prueba post hoc de Tukey. Todas las pruebas se consideraron significativas al 95% para todas las pruebas estadísticas con el programa SPSS STATISTICS® V25.0.0® IBM Corporation 1989, 2011, E.E.U.U.

VI. RESULTADOS

6.1. Ensilaje de grillo

Durante las 6 semanas (42 días) del proceso de hidrólisis ácido-enzimático y el monitoreo continuo no se observaron cambios de pH variando de 2.8 pH al inicio y se mantuvo en 3.2 de pH (Figura 3) a lo largo del tiempo.

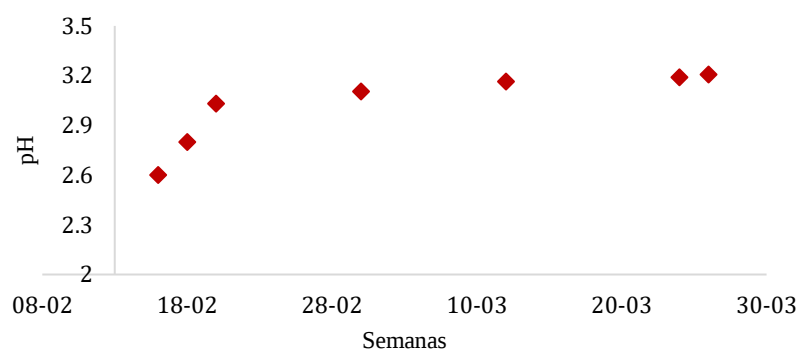


Figura 3. Valores de pH del proceso de ensilaje ácido hidrolizado de grillo.

6.2. Composición proximal del ensilaje

La composición proximal del ensilaje ácido hidrolizado de grillo (Cuadro 3) muestra un 39.3% de proteína cruda, 13.3% corresponde a la grasa cruda presente, 18.8% de ceniza y 4.08% de humedad. Aunque en el grillo seco se observó porcentajes superiores en proteína (42.5%), grasa cruda (14.9%), ceniza (5.9%) y humedad (7.0%) con respecto al ensilaje.

Cuadro 3. Análisis proximal de ensilaje vs. grillo seco.

Parámetros	Ensilaje	Grillo seco
Proteína cruda	39.30	42.59
Grasa cruda	13.32	14.93
Cenizas	18.88	5.9
Humedad	4.08	7.05

Los resultados son presentados por su media $\pm$ desviación estándar (n=3)

6.3. Ácidos grasos del ensilaje

El contenido de ácidos grasos en las diversas muestras mostró que el EAHG contiene mayor contenido de ácido graso linoleico (38.1%), oleico (33.5%) y palmítico (22.9%) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ácidos grasos identificados en ensilaje ácido hidrolizado de grillo.

Ácido graso	% del total
14:0	0.89
16:0	22.92
16:1	1.23
18:1n9	33.58
18:3n3	1.07
18:2n6	38.16
Otros*	2.15

Los resultados son presentados por la media $\pm$ desviación estándar (n=3)

**Proporción de ácidos no identificados*

6.4. Aminoácidos en grillo

Al cuantificar el perfil de aminoácidos en ensilaje (EAHG) y grillo seco (Cuadro 5) se observó que el ensilaje de grillo el porcentaje total de arginina, lisina y leucina corresponden a 9.07, 4.31 y 5.44 presentes en las muestras analizadas. Por el contrario, se

pudo apreciar que aminoácidos como metionina, histidina, cisteína y fenilalanina presentaron porcentajes inferiores de 0.51, 1.27, 1.45 y 2.12. En tanto el grillo seco mostró valores de 0.66, 1.18, 4.17, 5.46 y 7.54 pertenecen a histidina, metionina, lisina, leucina y arginina respectivamente (Figura 4).

Cuadro 5. Perfil de aminoácidos en grillo (g/100g de proteína).

	Grillo	
	Ensilaje	Seco
ASP	6.74	6.48
SER	5.55	5.33
GLU	11.20	10.89
GLY	20.99	24.36
HIS	0.51	0.66
ARG	9.07	7.54
THR	3.47	3.32
ALA	12.02	11.28
PRO	4.51	4.66
CYS	1.45	1.48
TYR	3.55	3.13
VAL	4.70	4.38
MET	1.27	1.18
LYS	4.31	4.17
ILE	3.11	3.36
LEU	5.44	5.46
PHE	2.12	2.32
SUMA	100	100

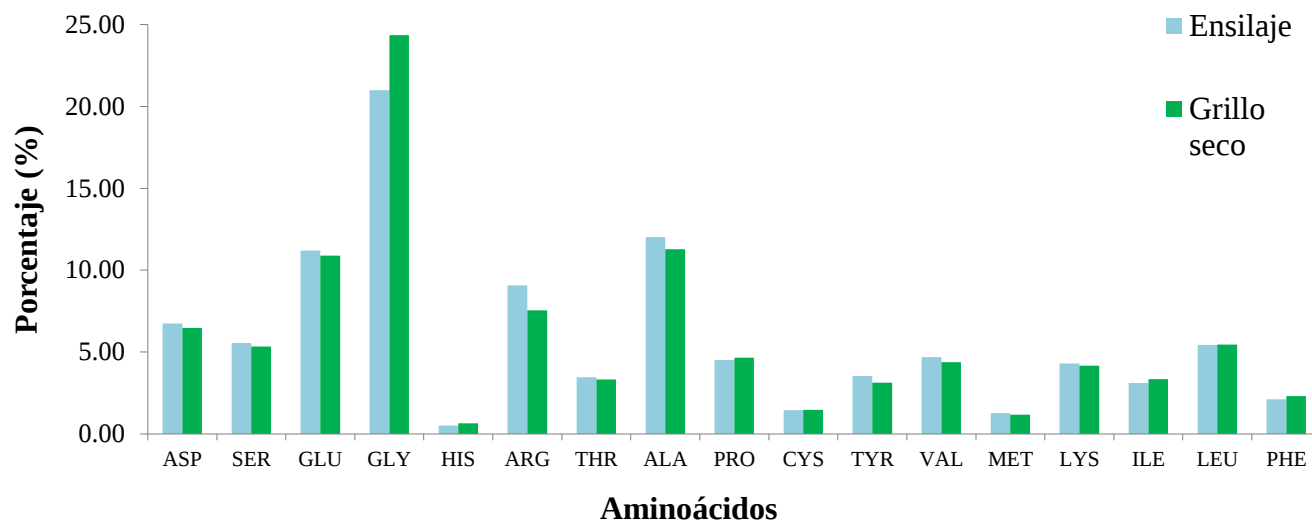


Figura 4. Perfil del porcentaje (%) total de aminoácidos en ensilaje ácido hidrolizado y grillo seco.

6.5. Quitina presente en grillo

El grillo *A. domesticus* al igual que el camarón blanco *L. vannamei* al tener un exoesqueleto formado principalmente de quitina la presencia del nitrógeno total puede sobreestimar el valor de la proteína disponible en ingredientes que lo presentan. Al realizar la cuantificación de la quitina en el EAHG y el grillo seco, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cantidad de quitina, al observar que hay 26.07 y 21.08% de quitina por cada 100 g de muestra en ensilaje y grillo seco, respectivamente. El análisis de nitrógeno no proteico (NNP) resultó en un 12.39 y 13.10% de nitrógeno no proteico en el ensilaje ácido hidrolizado (EAHG) y grillo seco (Cuadro 6).

Cuadro 6. Quitina en ensilaje y grillo seco dado en g / 100g.

Parámetros	Ensilaje	Grillo seco
Quitina (g/ 100g del producto)	26.07	21.08
% NNP en la quitina	12.39	13.10

Los datos presentan el contenido de quitina en la muestra total y el NNP en el contenido de la quitina total

6.6. Composición nutrimental de dietas, biomasa y hepatopáncreas

En dietas o tratamientos experimentales (Cuadro 7) se observó que el mayor porcentaje (%) de proteína lo presenta la dieta Control (D-Control) con 44.2% exclusivamente con harina de pescado, mientras que la menor composición en proteína lo presenta la dieta alto (D-Alto) con 39% y con valores intermedios similares en la dieta bajo (D-Bajo) y dieta medio (D-Medio) con 41.2%. Por otro lado, el mayor porcentaje de grasa cruda lo evidenció D-Bajo al tener 9.3%, seguida de D-Alto con 9.1, y 9.04% para D-Medio y con menor presencia fue D-Control con 8.2%.

Con respecto a cenizas, la D-Alto presentó el mayor contenido al reflejar 6.9 sobre 6.2% en D-Control, y finalmente el mayor contenido de humedad se mostró en D-Control con 4.5%, seguida de D-Medio, D-Alto y D-Bajo (2.8, 2.3 y 2.3%) respectivamente.

Cuadro 7. Análisis proximal de dietas dados en g / 100 g.

Parámetros	Tratamientos			
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto
Proteína cruda	44.24	41.22	41.25	39.00
Grasa cruda	8.25	9.31	9.04	9.10
Cenizas	6.21	6.37	6.79	6.90
ELN	41.30	42.98	42.60	44.26
Humedad	4.55	2.31	2.83	2.38

Los resultados son presentados por la media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracto Libre de Nitrógeno (ELN) obtenido por diferencia = (PC+GC+C)-100

Después de 64 días del bioensayo, se analizó la composición proximal en los camarones *L. vannamei*. Los valores se presentan en la Cuadro 8. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de proteína y cenizas, con valores mínimos de 86.1 % de proteínas en D-Bajo y máximo de 95.3% en D-Alto. Por otra parte, en cenizas el valor máximo se presentó en el tratamiento alto (D-Alto) con 6.6% y el mínimo fue para el tratamiento control (D-Control) con 5.7%.

Con relación a grasa cruda y humedad no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) pero si mostró un valor inferior en tratamiento medio (D-Medio) de 1.5% de lípidos con respecto a 1.7% presente en músculo en tratamiento control (D-Control). Con relación a humedad el tratamiento con alto porcentaje fue para D-Bajo al observarse un 75.2% sobre 72.5 en D-Control.

Cuadro 8. Proximales químicos en músculo de camarón g / 100 g de tejido seco.

Parámetros	Tratamientos				valor <i>p</i>
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto	
Proteína cruda	91.31 ^{ab} ± 1.57	86.10 ^b ± 2.76	93.16 ^{ab} ± 4.18	95.32 ^a ± 2.75	0.026
Grasa cruda	1.71 ± 0.07	1.61 ± 0.05	1.52 ± 0.04	1.60 ± 0.10	0.245
Ceniza	5.79 ^c ± 0.16	6.20 ^b ± 0.20	6.28 ^{ab} ± 0.05	6.63 ^a ± 0.12	0.001
Humedad	72.50 ± 1.13	75.23 ± 2.92	74.34 ± 0.21	72.70 ± 1.58	0.238

Los resultados son presentados por su media ± desviación estándar (n=3)

*Los superíndices (^{a, b, c}) muestran los grupos con diferencias significativas (*p* < 0.05)*

Finalmente, el contenido de grasa cruda en las muestras del hepatopáncreas no presentaron diferencias significativas (*p* < 0.05) en los distintos tratamientos (Cuadro 9), pero si se observaron valores mínimos en el tratamiento (D-Bajo) con 21.1% por debajo de 28.5% del tratamiento control (D-Control).

Cuadro 9. Análisis en muestras de hepatopáncreas de camarón g / 100 g de tejido.

Tratamientos	Grasa cruda	Humedad
D-Control	28.52 + 1.88	69.86 + 0.76
D-Bajo	21.17 + 0.22	70.75 + 0.07
D-Medio	24.10 + 3.42	71.17 + 0.36
D-Alto	22.43 + 0.30	71.52 + 0.83
valor <i>p</i>	0.392	0.564

Los resultados están representados por la media $\pm$ desviación estándar ($n=3$)
Diferencias significativas ($p < 0.05$) en muestras

6.7. Desempeño productivo

Al realizar el análisis estadístico en el desempeño productivo de camarón *L. vannamei* con los distintos tratamientos (Cuadro 10), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en diversos indicadores evaluados. La biomasa final en el tratamiento control (D-Control) resultó con un peso de 145.7 g, por encima de los tratamientos D-Medio, D-Alto y D-Bajo (109.5 g, 108.1 g y 1.06.5 g) respectivamente. De igual manera el peso individual final resultó con valores máximos de 10.4 g en tratamiento D-Control mayor a los 7.2 g en tratamiento alto (D-Alto) ($p < 0.05$). Asimismo, se registró una mejor ganancia de peso en tratamiento D-Control de 6.1 g sobre 3.89 g, 3.7 g y 2.8 g para D-Bajo, D-Medio y D-Alto respectivamente. En consecuencia, de la diferencia en peso, la tasa de crecimiento específico (SGR) calculada resultó en valores significativos en D-Control (1.37 g) sobre D-Alto con 0.79 g. De igual manera, el coeficiente térmico de crecimiento (TGC) mostró valores mayores significativos ($p < 0.05$) en D-Alto con 0.16, D-Medio de 0.20 y D-Bajo con 0.21 en comparación con 0.30 de tratamiento control (D-Control).

La ingestión de alimento mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) siendo mayor en las dietas con EAHG que la control, con 4.12 g, 5.16 g, 5.11 g y 5.12 g de alimento consumido a lo largo del bioensayo en los tratamientos D-Control, D-Bajo, D-Medio y D-Alto,

respectivamente con 4.12%, 5.16%, 5.11% y 5.12% de alimento consumido a lo largo del bioensayo en los tratamientos D-Control, D-Bajo, D-Medio y D-Alto, respectivamente. Resultado que alcanzó a mostrar diferencias en la conversión, pero sin favorecer a las dietas con EAHG ($p < 0.05$). Aun así, se presentaron diferencias significativas en el factor de conversión alimenticia (FCR) ($p < 0.05$) para el tratamiento D-Control resultó con el valor más bajo (3.05) seguido por el D-Bajo (4.84), D-Medio (5.08) y D-Alto (6.67).

Con relación a los índices corporales, no se observaron diferencias significativas en los valores del índice hepatosomático (HSI) ($p < 0.05$) entre los 4 tratamientos experimentales.

Finalmente, en cuanto a la supervivencia observada en el bioensayo se encontraron diferencias significativas entre tratamientos al observar que en el tratamiento (D-Alto) y (D-Bajo) tuvieron el 100% de supervivencia, mientras que en el D-Medio resultó con el 95.5% y el 91.1% correspondió al D-Control.

*Cuadro 10. Datos de crecimiento y rendimiento productivo de camarón *L. vannamei*.*

Parámetros	Tratamientos				valor <i>p</i>
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto	
Peso individual inicial (g)	4.33 ± 0.11	4.33 ± 0.06	4.31 ± 0.02	4.32 ± 0.03	0.992
Peso individual final (g)	10.43 ± 0.41 ^a	8.22 ± 0.18 ^b	8.07 ± 0.27 ^b	7.21 ± 0.30 ^b	0.001
Peso biomasa final (g)	145.78 ± 0.80 ^a	106.51 ± 7.15 ^b	109.57 ± 7.46 ^b	108.14 ± 0.41 ^b	0.003
Ganancia de peso (g)	6.10 ± 0.30 ^a	3.89 ± 0.13 ^b	3.76 ± 0.27 ^b	2.89 ± 0.31 ^b	0.001
Ganancia de peso (%)	140.83 ± 3.54 ^a	89.80 ± 2.52 ^b	87.38 ± 6.23 ^b	67.10 ± 7.59 ^b	0.001
SGR (%/día)	1.37 ± 0.02 ^a	1.00 ± 0.02 ^b	0.97 ± 0.05 ^b	0.79 ± 0.07 ^b	0.001
TCA g/g	3.05 ± 0.17 ^b	4.84 ± 0.14 ^{ab}	5.08 ± 0.36 ^a	6.67 ± 0.77 ^a	0.003
CA % /día	4.12 ± 0.06 ^a	5.16 ± 0.22 ^b	5.11 ± 0.20 ^b	5.12 ± 0.15 ^b	0.008
HSI (g /100g org)	4.13 ± 0.21	4.54 ± 0.00	4.28 ± 0.25	3.76 ± 0.47	0.345
TGC ((g ^{1/3} (°C/día))	0.30 ± 0.00 ^a	0.21 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	0.001
Supervivencia	91.11 ± 3.84 ^b	100 ± 0.00 ^a	95.55 ± 7.69 ^{ab}	100 ± 0.00 ^a	0.035

Los resultados son presentados por su media ± error de desviación estándar (n=3)

Los superíndices (^{a, b}) muestran los grupos significativamente diferentes (p< 0.05)

SGR: Tasa de crecimiento específico, TCA: Tasa de conversión alimenticia, CA: Consumo de alimento, HSI: Índice hepatosomático, TGC: Coeficiente térmico de crecimiento.

6.8. Perfil de ácidos grasos en las dietas y camarones (% de ácidos grasos totales)

La presencia de ácidos grasos en las dietas mostró tener un mayor contenido de ácido palmítico (C16:0) en la dieta control (D-Control) de 27% con respecto a las 3 dietas de EAHG. No obstante, en la dieta alto (D-Alto) se observó mayor contenido de ácido esteárico (C18:0) de 7.3% que en la dieta control (4.12%). Por otra parte, el ácido oleico (C18:1n9), se observó menor contenido en D-Control (18.2%) con relación a los tratamientos experimentales, siendo la dieta D-Medio el tratamiento con mayor contenido (26.2%) de este ácido graso. Por otro lado, para los ácidos grasos omega 3 (C20:5n3 y C22:6n3) y 6 (C20:4n6) se observaron que la dieta control tuvo mayor contenido que en las dietas de EAHG. No obstante, el ácido linoleico (C18:2n6) presento mayor contenido en la dieta alta (D-Alto) con relación a la dieta control (D-Control), mientras que el ácido linolénico (18:3n3) el mayor contenido se observó en la dieta medio (D-Medio).

Cuadro 11. Identificación de ácidos grasos presentes en dietas (% del total de ácidos grasos).

Ácido graso	Tratamientos			
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto
12:00	0.42	-	-	-
14:00	6.05	2.72	1.85	1.38
16:00	27.05	22.94	20.8	20.84
16:01	7.10	3.81	2.65	2.35
17:01	2.35	2.21	1.74	1.62
18:00	4.12	5.41	6.25	7.34
18:1n9	18.20	22.91	26.21	23.41
20:1n9	1.57	0.75	0.52	-
18:3n3	1.71	2.33	2.66	2.05
20:3n3	0.76	0.56	0.46	-
20:5n3	0.29	0.26	0.26	0.20
22:6n3	3.86	1.88	0.97	0.51
18:2n6	17.24	29.82	34.15	39.14
20:4n6	4.42	1.51	0.56	0.53
Otros *	1.23	1.111	0.9	0.64

Los resultados son presentados por su media $\pm$ error de desviación estándar (n=3)

Los superíndices (^{a, b, c}) muestran los grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Los datos de perfil de ácidos grasos en el músculo se muestran en el Cuadro 12. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos experimentales y D-Control en ácidos grasos saturados (SFA) como el mirístico (14:0) y palmítico (16:0) mientras que el 20:0 (ácido araquídico) y el 18:0 (esteárico) no presentaron diferencias con respecto a los tratamientos. Sin embargo, el porcentaje de ácido palmítico (16:0) es más alto en D-Control al contener 22.2% con relación a los tratamientos experimentales 20.7% (D-Bajo), 14.6% (D-Medio) y 14.5% para D-Alto. Con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) como el 18:1n7 y 20:1n7 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, en el ácido palmitoleico (16:1) sí se observaron diferencias. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA-LC) como el DHA (22:6n3) y EPA (20:5n3), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, pero el ácido araquidónico (20:4n6) sí hubo diferencias entre el tratamiento D-control y los tratamientos experimentales al contener 11.1% en D-Control, 7.8% para D-Bajo, 7.3% para D-Medio y 6.5% en D-Alto.

Cuadro 12. Composición relativa de los ácidos grasos en músculo de camarón blanco del Pacífico L. vannamei.

Ácido Graso	Tratamientos (% del total)				valor <i>p</i>
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto	
14:0	2.17 ± 0.09 ^{ab}	2.41 ± 0.23 ^a	1.55 ± 0.13 ^b	1.93 ± 0.03 ^{ab}	0.015
16:0	22.24 ± 0.94 ^a	20.74 ± 0.90 ^a	14.59 ± 0.65 ^b	14.47 ± 0.53 ^b	0.001
16:1	3.72 ± 0.55 ^a	2.64 ± 0.15 ^{ab}	1.70 ± 0.08 ^b	1.74 ± 0.05 ^b	0.004
17:1	2.75 ± 0.54	2.28 ± 0.11	1.75 ± 0.02	1.69 ± 0	0.081
18:0	9.76 ± 0.67	10.28 ± 0.53	10.34 ± 0.35	10.50 ± 0.05	0.715
20:0	2.17 ± 0.38	2.07 ± 0.16	1.87 ± 0.15	1.95 ± 0.06	0.801
18:1n9	16.02 ± 0.37	17.21 ± 0.78	18.68 ± 0.66	16.59 ± 0.47	0.062
20:1n9	2.48 ± 0.19	2.40 ± 0.08	2.49 ± 0.06	2.44 ± 0.07	0.98
18:3n3	0 ^c	1.84 ± 0.30 ^b	2.35 ± 0.15 ^{ab}	2.83 ± 0.04 ^a	0.001
20:3n3	3.63 ± 0.43	3.28 ± 0.45	3.84 ± 0.22	3.98 ± 0.10	0.531
20:5n3	1.15 ± 0.17	1.98 ± 0.89	1.32 ± 0.28	1.71 ± 0.02	0.618
22:6n3	7.05 ± 0.52	7.43 ± 0.01	8.85 ± 0.87	8.55 ± 0.34	0.124
18:2n6	7.44 ± 0.30 ^c	10.42 ± 0.30 ^b	13.73 ± 0.46 ^a	14.04 ± 0.10 ^a	0.001
20:2n6	0 ^b	2.36 ± 0.54 ^a	2.61 ± 0.38 ^a	2.66 ± 0.20 ^a	0.002
20:4n6	11.11 ± 0.54 ^a	7.84 ± 0.37 ^b	7.33 ± 0.28 ^b	6.59 ± 0.02 ^b	0.001
Otros	7.76 ± 0.27 ^a	8.29 ± 0.10 ^a	7.67 ± 0.18 ^b	8.15 ± 0.01 ^a	0.001

Los resultados son presentados por su media ± error de desviación estándar (n=3)

*Los superíndices (^{a, b, c}) muestran los grupos significativamente diferentes (*p* < 0.05)*

Por último, en el Cuadro 13, se reporta el perfil de ácidos grasos cuantificados en el hepatopáncreas. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los ácidos grasos 17:1, 18:0 y 20:3n3. Mientras que los ácidos grasos esenciales como ARA (20:4n6), EPA (20:5n3) y DHA (22:6n3), si se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Es así como el mayor contenido de acumulación (5.4%) de ácido araquidónico (20:4n6) se presentó en tratamiento control (D-Control) con respecto a 0.76% presente en D-Alto. Por otro lado, el EPA mostró mayor contenido en los tratamientos con ensilaje ácido hidrolizado de grillo. Mientras que el DHA se observó que, el tratamiento D-Control tuvo mayor porcentaje de acumulación de 5.7% sobre 2.4% presente en el tratamiento D-Alto. Con relación al ácido linoleico (18:2n6) reflejó mayor acumulación en el hepatopáncreas del tratamiento D-Alto con 22.9% en comparación con D-Control (12.2%). Sin embargo, para el ácido linoleico (18:3n3) precursor de los ácidos grasos poliinsaturados n3, mostró mayor acumulación en tratamiento D-Medio con 2.4% que dieta control al tener 1.1%.

Si bien las figuras 5, 6, 7 y 8 de ácidos grasos de las dietas experimentales comparados con los tratamientos de músculo y hepatopáncreas se observaron que la acumulación de 18:1n9 es mayor que el suministrado en las dietas. No obstante, la utilización del ácido palmítico (16:0) mostró que es similar al suministrado entre las dietas y los tratamientos del hepatopáncreas. Por el contrario, el 18:2n6 (ácido linoleico) se observó que, hay utilización mayor en el hepatopáncreas que las aportadas en las dietas. Finalmente, el EPA y DHA tiene mayor acumulación en todos los tratamientos de músculo en comparación con hepatopáncreas y la dietas.

Cuadro 13. Identificación de ácidos grasos en hepatopáncreas.

Ácido Graso	Tratamientos (% del total)				valor <i>p</i>
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto	
14:0	2.78 ± 0.11 ^a	1.83 ± 0 ^b	1.20 ± 0.03 ^c	1.07 ± 0.04 ^c	0.001
16:0	24.41 ± 0.60 ^a	18.65 ± 0.14 ^b	17.86 ± 0.48 ^b	17.97 ± 0.18 ^b	0.001
16:1	5.08 ± 0.22 ^a	2.86 ± 0.02 ^b	1.98 ± 0.06 ^c	1.75 ± 0.03 ^c	0.001
17:1	0.98 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.88 ± 0.02	3.89 ± 0.02	0.092
18:0	3.88 ± 0.27	4.20 ± 0.15	4.51 ± 0.08	4.19 ± 0.53	0.593
18:1n9	28.42 ± 0.34 ^c	38.46 ± 0.25 ^b	42.81 ± 0.63 ^a	42.43 ± 1.22 ^a	0.001
20:1n9	3.52 ± 0.11 ^a	2.24 ± 0.01 ^b	1.46 ± 0.07 ^c	1.12 ± 0.03 ^d	0.001
18:3n3	1.12 ± 0 ^d	2.19 ± 0.03 ^c	2.48 ± 0.02 ^a	2.37 ± 0.02 ^b	0.001
20:3n3	0.72 ± 0.04	0.70 ± 0.05	0.69 ± 0.06	0.68 ± 0.02	0.924
20:5n3	0.23 ± 0.01 ^b	0.46 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	0.001
22:6n3	5.73 ± 0.29 ^a	3.85 ± 0.08 ^b	2.61 ± 0.03 ^c	2.40 ± 0.08 ^c	0.001
18:2n6	12.26 ± 0.25 ^d	18.11 ± 0.06 ^c	21.06 ± 0.12 ^b	22.92 ± 0.75 ^a	0.001
20:2n6	1.07 ± 0 ^a	0.92 ± 0.01 ^b	0.91 ± 0.03 ^b	0.90 ± 0.04 ^b	0.007
20:4n6	5.45 ± 0.40 ^a	2.78 ± 0.19 ^b	1 ± 0.04 ^c	0.76 ± 0.01 ^c	0.001
Otros	3.73 ± 0.04 ^a	1.76 ± 0.01 ^b	0 ^c	0 ^c	0.001

Los resultados son presentados por su media ± error de desviación estándar (n=3)

Los superíndices (^{a, b, c, d}) muestran los grupos significativamente diferentes (*p* < 0.05)

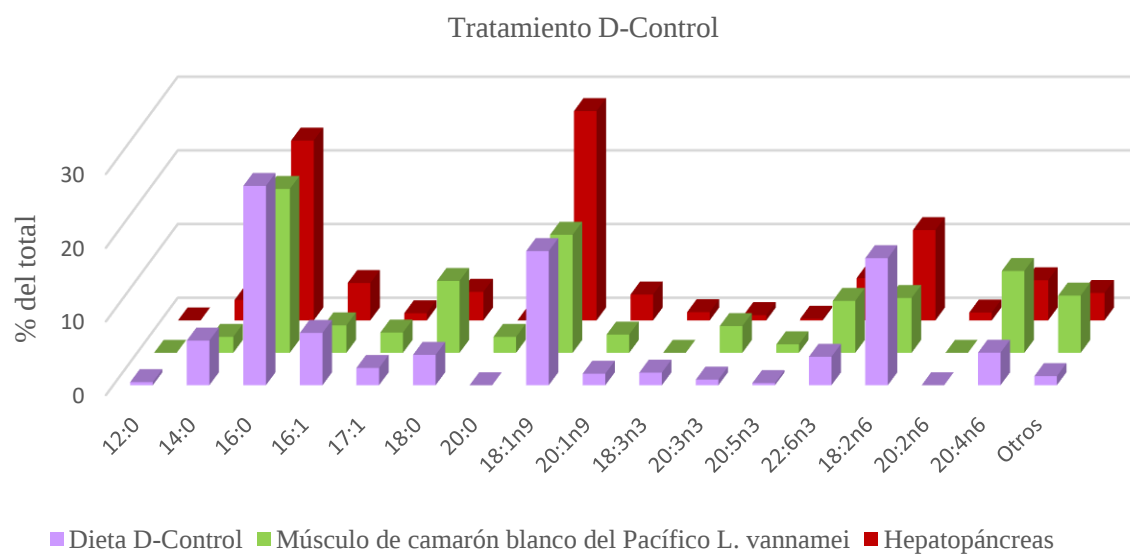
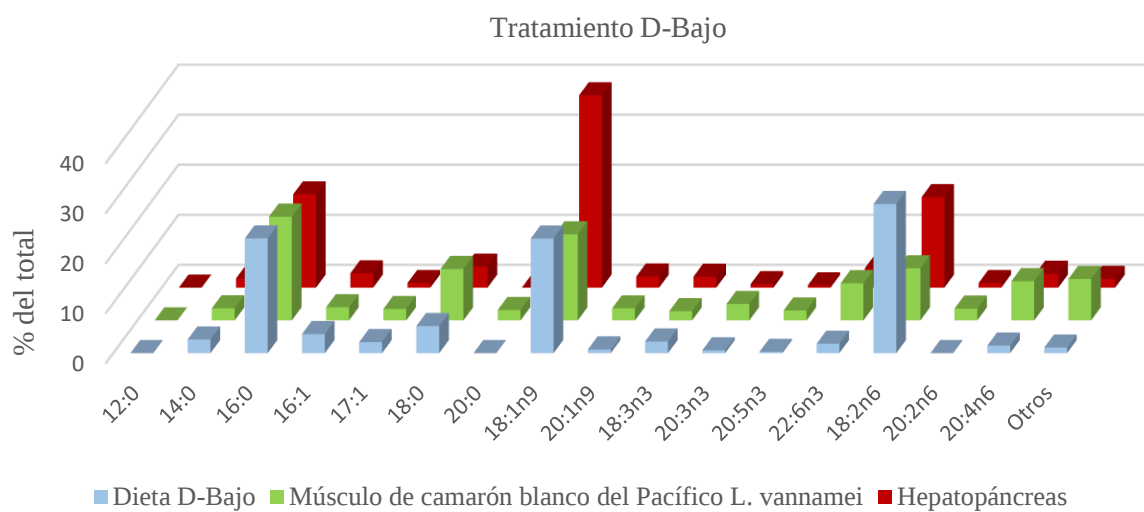


Figura 5. Músculo y hepatopáncreas de camarón blanco del Pacífico comparado entre dieta D-Control.



*Figura 7. Dieta D-Bajo comparado en músculo y hepatopáncreas de camarón camarón *L. vannamei*.*

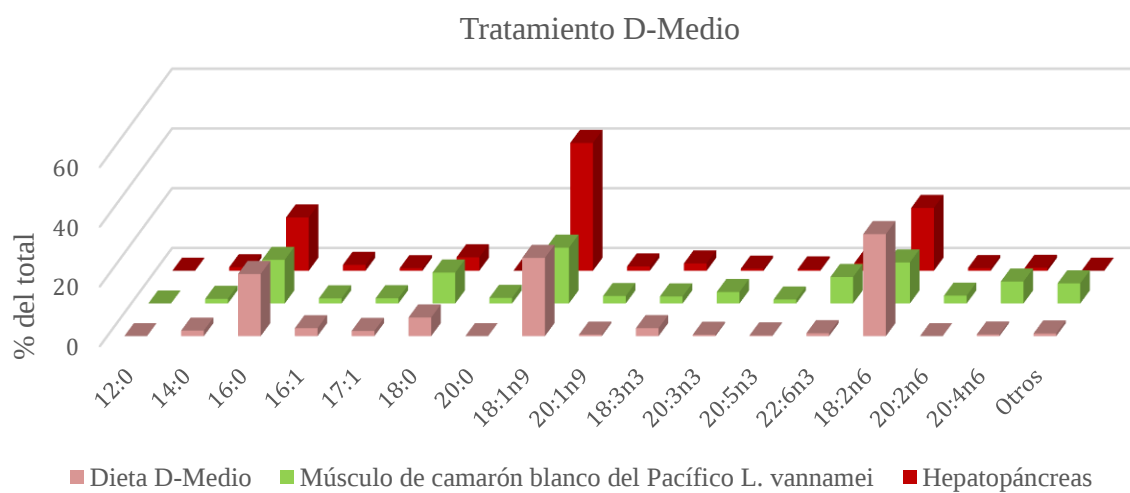


Figura 7. Comparación de dieta D-Medio en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei*.

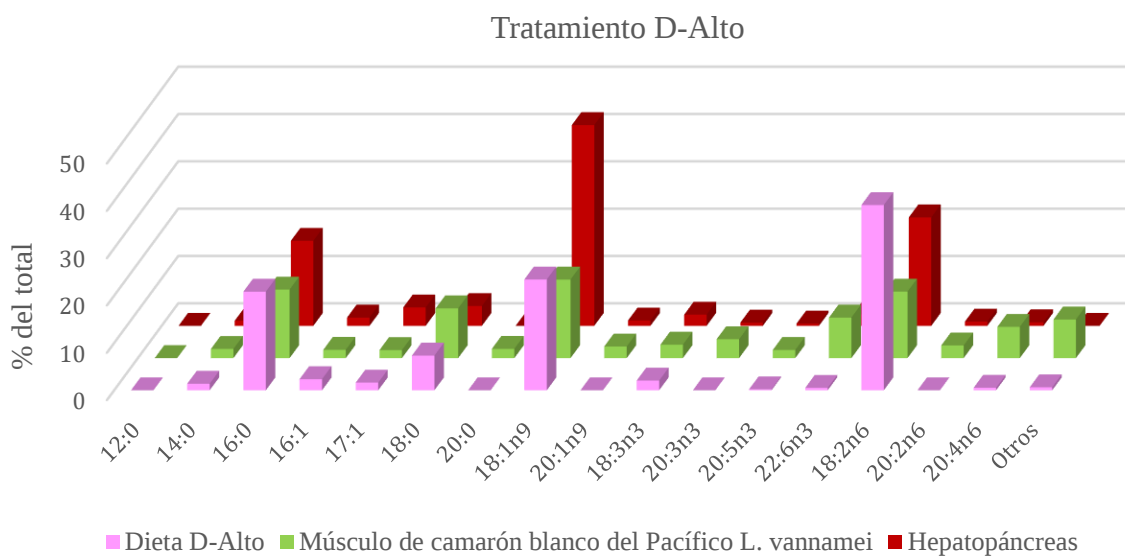


Figura 8. Comparación de la dieta D-Alto con respecto músculo y hepatopáncreas de camarón blanco del Pacífico.

6.9. Digestibilidad aparente en porcentaje de la dieta

No se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la digestibilidad de las dietas experimentales con respecto a la dieta control (D-Control). Los valores de digestibilidad oscilaron entre 72.5 % a 75.7% de la materia seca (Cuadro 14).

Cuadro 14. Valores de digestibilidad aparente en materia seca (%) (MS) en camarón L. vannamei de las dietas experimentales.

Tratamientos	MS (%)
D-Control	75.77 $\pm$ 2.11
D-Bajo	74.76 $\pm$ 1.16
D-Medio	72.63 $\pm$ 1.12
D-Alto	72.54 $\pm$ 2.77
valor p	0.180

Los resultados son presentados por la media $\pm$ desviación estándar (n=3)

6.10. Perfil de aminoácidos reportados como g/ 100g de aminoácidos

Los valores del porcentaje (%) total de aminoácidos cuantificados en las dietas se reportan en el Cuadro 15. No se detectó histidina en las dietas con ensilaje ácido hidrolizado de grillo (EAHG), pero si en la dieta D-Control con un valor de 0.05%. Los valores de arginina en dieta resultaron similares en las cuatro dietas al contener 6.02 (D-Bajo), 6.15 (D-Control), 6.29 (D-Medio) y 6.83% (D-Alto). Para valores de metionina en las dieta, los más altos fueron detectados en la dieta D-Bajo con 3.46 y los menores en la dieta D-Medio con 2.71%. Con relación a los valores de leucina en dieta los más bajos fueron para la dieta D-Alto (5.75%) y D-Medio (5.79%), mientras que D-Control tuvo un valor mayor de 7.04. Por último, los valores de fenilalanina en dieta fueron mayores en la D-Medio con un valor de 5.10%, mientras que la menor fue 2.28% en D-Alto.

Con respecto a la cantidad de metionina en el músculo se cuantificó 1.70% en el tratamiento D-Control con valores mayores que el D-Medio (1.41%), D-Bajo (1.32%) y D-Alto (1.30%). Sin embargo, se observó que el tratamiento D-Alto tuvo 0.99% de cisteína y el tratamiento D-Control reflejó el 0.45% de este aminoácido. Con relación a la arginina en músculo en tratamiento D-Control y D-Medio no fueron mayores del 6%, puesto que presentaron valores de 5.66 y 5.97%, respectivamente. Mientras que el tratamiento D-Bajo presentó 6.17 y D-Alto mostró 6.77%. La presencia de leucina en muestra de músculo presenta valores equivalentes entre los cuatro tratamientos ya que presentaron 4.37 (D-Alto), 4.49 (D-Bajo), 4.50 (D-Medio) y 4.96% (D-Control). Cabe señalar que la glicina tuvo el porcentaje más alto entre los aminoácidos presentes en los perfiles de grillo, dietas y músculo (Figura 4, 9 y 10), seguido por el glutamato solamente en los perfiles de dieta y músculo (Figura 9, 10) ya que, en el perfil de grillo éste, se encuentra en el tercer lugar en abundancia al estar precedido por alanina (Figura 4).

Cuadro 15. Porcentaje (%) total de aminoácidos en dieta y músculo con relación a los aminoácidos totales.

AA	Dieta				Músculo			
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto
ASP	6.55	6.41	6.34	6.52	6.73	6.24	6.01	5.83
SER	4.73	1.14	4.76	4.92	3.59	0.73	0.62	0.57
GLU	15.06	14.51	13.8	13.89	13.38	12.37	11.78	11.41
GLY	24.45	27.34	22.32	22.13	35.56	41.15	43.36	43.56
HIS	0.05	Nd	Nd	Nd	0.48	0.43	0.38	0.31
ARG	6.15	6.01	6.27	6.82	5.66	6.17	5.97	6.77
THR	4.3	4.34	4.4	4.25	2.49	2.27	2.27	2.37
ALA	9.45	8.53	8.82	9.43	6.9	6.46	6.03	6.41
PRO	2.48	5.98	6.32	6.73	4.65	3.85	3.49	3.23
CYS	2.22	1.77	2.16	2.22	0.45	0.78	0.87	0.99
TYR	1.37	1.48	1.66	1.92	1.63	1.76	1.71	1.72
VAL	4.41	4.1	4.27	4.52	2.09	2.52	2.5	2.49
MET	3.16	3.45	2.7	3.14	1.7	1.32	1.41	1.3
LYS	3.14	3.02	2.58	2.69	4.93	5.02	4.82	4.51
ILE	2.86	2.81	2.74	2.82	2.73	2.5	2.41	2.33
LEU	7.04	6.63	5.77	5.74	4.96	4.49	4.5	4.37
PHE	2.59	2.47	5.08	2.28	2.09	1.93	1.86	1.82
SUMA	100	100	100	100	100	100	100	100

*Nd: porcentaje de aminoácidos no detectados

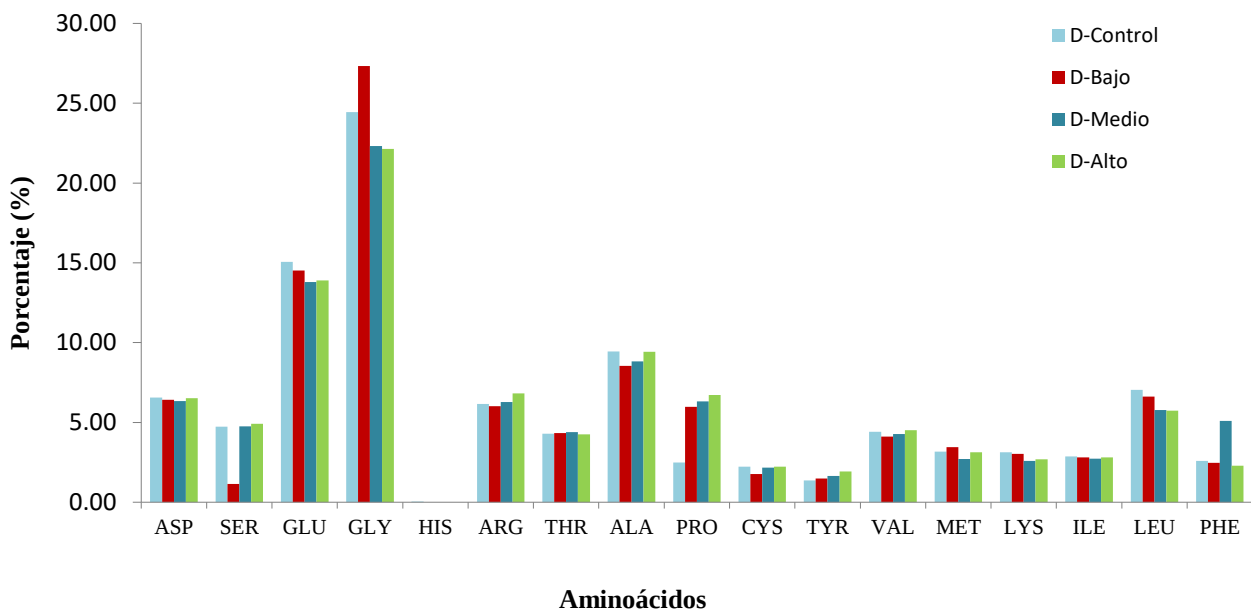


Figura 9. Perfil de porcentaje (%) total de aminoácidos en dietas experimentales.

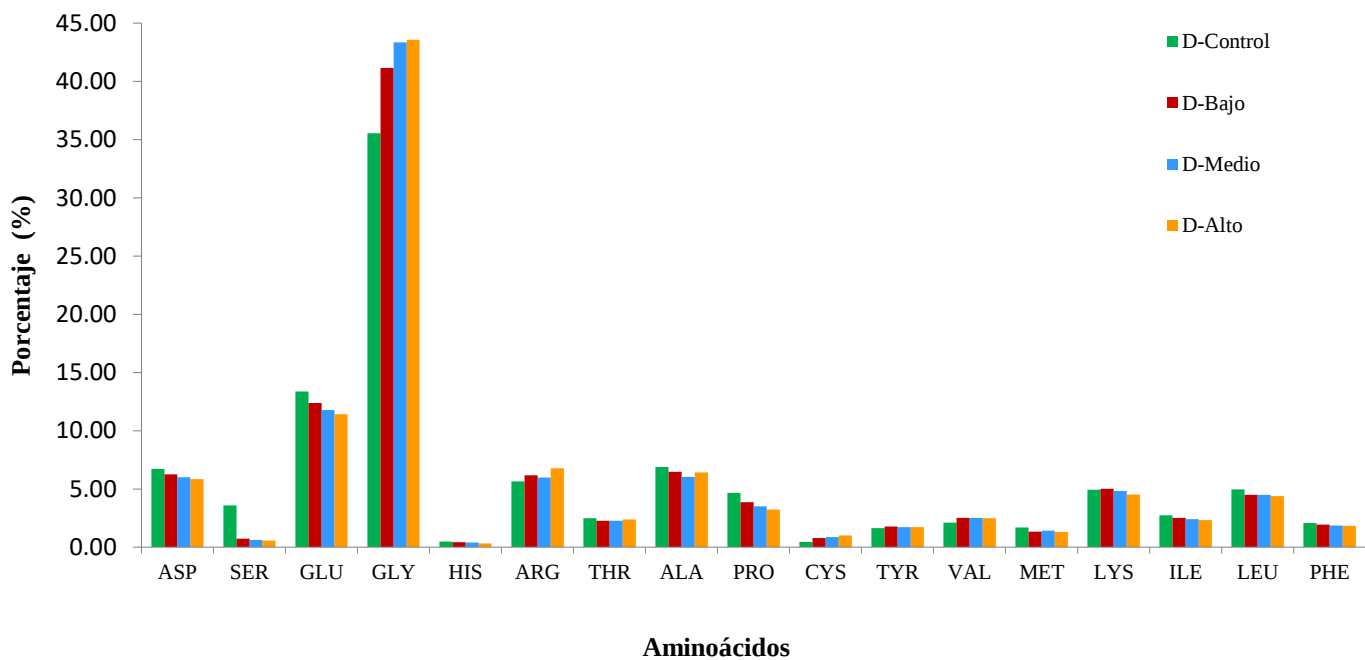


Figura 10. Perfil de porcentaje (%) total de aminoácidos en el músculo del camarón *L. vannamei*.

6.11. Análisis bioquímico en hemolinfa

Los parámetros cuantificados en la hemolinfa de los camarones alimentados con las cuatro dietas; las tres con EAHG y un tratamiento control (D-Control) se presentan en el Cuadro 16. Se encontraron valores de glucosa estadísticamente distintos ($p < 0.005$) en los tratamientos D-Bajo (9.62 mg/dL), D-Control (10.07 mg/dL) y D-Alto (11.79 mg/dL) con respecto a D-Medio (6.77 mg/dL). En cuanto a proteína total y el colesterol no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos experimentales.

*Cuadro 26. Análisis bioquímico en hemolinfa de camarón *L. vannamei*.*

Parámetro sanguíneo	Tratamientos				valor p
	D-Control	D-Bajo	D-Medio	D-Alto	
Proteína total (g/dL)	10.01 $\pm$ 1.12	9.38 $\pm$ 0.52	9.56 $\pm$ 1.01	9.66 $\pm$ 0.34	0.235
Glucosa (mg/dL)	10.07 $\pm$ 0.52 ^b	9.62 $\pm$ 0.61 ^b	6.77 $\pm$ 0.28 ^a	11.79 $\pm$ 1 ^b	0.001
Colesterol (mg/dL)	17.54 $\pm$ 1.08	19.93 $\pm$ 1.45	19.39 $\pm$ 1.46	21.69 $\pm$ 1.28	0.186

Los resultados son presentados por la media $\pm$ y error de desviación estándar ($n=3$)

Los superíndices (^{a, b}) muestran los grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$)

VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró que el EAHG no cumplió con los requerimientos nutricionales del camarón blanco del Pacífico, de igual manera que la harina de pescado. De hecho, la tendencia en crecimiento fue disminuir significativamente a medida que el EAHG aumentó. Estos resultados hacen que la hipótesis establecida no sea validada, por lo que se debe analizar la implicación y posibles causas de los observado. El hecho de que esto no se haya cumplido, fue en efecto una preocupación para abordar la discusión de este trabajo. El grillo contiene una alta concentración de quitina, compuesto que forma su exoesqueleto, el cual teóricamente no debería variar. Sin embargo, como cualquier organismo sometido a la producción animal, debería tener un índice de condición ideal. Este comentario va con relación a que la quitina está compuesta por carbohidratos N-acetil-glucosamina (Jonas-Levi & Martínez, 2017; Pan *et al.*, 2022) nitrógeno que al realizar un análisis de Kjeldahl nos estaría dando una sobreestimación de la proteína cruda. Este hecho, nos llevó a formular las dietas considerando un factor de 4.76 en lugar de 6.25 para multiplicarlo por el valor del contenido de nitrógeno (Janssen *et al.*, 2017). Aun así y para corroborar, al final del presente estudio se llevó a cabo un análisis para la cuantificación de quitina en el material utilizado (Kandile, 2018) para posteriormente determinar el nitrógeno total en la quitina y así valorar directamente el nitrógeno no proteico (NNP) (AOAC, 2015). De esta manera se percató que el contenido de NNP era mayor al reportado en la literatura (Janssen *et al.*, 2018). Es así como se estimó un contenido de quitina mayor, probablemente por tratarse de grillos en estado de subalimentación, y por consecuencia se sobreestimó el contenido de proteína de acuerdo con la proporción de grillo incluido.

El ensilaje es un proceso alternativo de conservación. El término ensilar ha sido empleado en la ganadería al almacenamiento de forraje verde para ser aprovechado durante las épocas de desabasto. Dentro de los recursos pesqueros, dicho término y práctica fue utilizada desde los años 20s del siglo pasado, principalmente para denominar el proceso de conservación, aprovechamiento y manejo de residuos pesqueros provenientes del procesamiento de plantas de pescado productoras de filetes y a partir de aquellas especies acuáticas que no eran aptas para consumo humano. En los años 80s este proceso se utilizó

como una alternativa de conservación para dietas de salmón, principalmente en países como Noruega.

A diferencia del ensilaje para forraje, el cual se basa en una fermentación, el de pescado se realiza y se conserva con la adición de ácidos, los cuales se produce una hidrólisis (o autólisis por las enzimas ácidas presentes en el estómago). En teoría este proceso debe dar como resultado un producto con calidad nutricional similar a la harina de pescado con la diferencia de tener costos más bajos tanto en su producción como en su almacenamiento. Además, el ensilaje ácido de pescado es una práctica que evita la contaminación ambiental y favorece la reutilización de residuos sólidos obtenidos de las actividades acuícolas y de pesca (Afreen & Ucak, 2020; Vidotti *et al.*, 2003).

El ensilaje ácido de pescado, al estar constituido por vísceras en las cuales existen una alta cantidad de enzimas digestivas, entre ellas la pepsina, que al ser una proteasa ácida se activa a pHs menores de 6 y de esta manera promover la hidrólisis en presencia de los ácidos. Este producto hidrolizado, solía estar combinado con otros residuos de pescado sin ensilar (crudos) que al combinarse con el hidrolizado ácido y una fuente de harina con aglutinantes se obtenía la mezcla perfecta para la elaboración de alimentos semi-húmedos para salmón (Ahuja *et al.*, 2020; Martin, 2007; Tatterson & Windsor, 1974). A diferencia de las vísceras de pescado, el grillo no cuenta con las suficientes proteasas ácidas para activar una hidrólisis similar a la del ensilaje de pescado, por lo que se optó el agregar pepsina de cerdo comercial para obtener un resultado similar, favoreciendo la hidrólisis proteica y a su vez desprendiendo los nutrientes del exoesqueleto (Piper and Fenton, 1965).

Si bien, las dietas en el presente trabajo fueron formuladas, para ser isoproteicas e isolipídicas, al analizar el nitrógeno no proteico (NNP) proveniente de los grillos así utilizados y restarlo al nitrógeno total, nos arrojó valores decrecientes en proteína disponible que, en parte pudo afectar el crecimiento. Vale la pena aclarar que, aunque este ajuste se consideró al formular las dietas, se hizo un segundo ajuste al tratar de explicarnos el porqué de las diferencias en crecimientos al incluir el EAHG en las dietas. Es así como se hizo la cuantificación de la quitina de los grillos utilizados y resultando en un valor del 26%, lo cual es mayor al valor reportado por (Janssen *et al.*, 2017) que era del 12%. Al hacer este segundo

ajuste se observó una reducción de hasta 5% de proteína. Diferencia que probablemente haya sido una de las razones que expliquen la reducción de crecimiento.

De acuerdo con Fagbenro & Jauncey (1993) así como Mustătea *et al.* (2019) y Tadesse *et al.* (2020) el proceso de fabricar un ensilaje genera cambios en el producto debido al conjunto de reacciones paralelas que rompen enlaces peptídicos y generan la separación del sobrenadante que contiene las proteínas, péptidos y aminoácidos de los sólidos insolubles generando agua a consecuencia de la ruptura de los enlaces peptídicos. Experiencias previas en este laboratorio del IIO (UABC), demostraron que el ensilaje ácido de subproductos pesqueros puede conservar sus propiedades nutricionales al utilizarlo hasta un cierto límite en el total de la formula (López & Viana, 1995). Sin embargo, es importante aclarar que los casos mencionados anteriormente fueron para fabricar ensilaje de pescado y no de grillo, por lo que resulta difícil hacer la comparación. El EAHG conservó un aspecto mucho más espeso que el que se obtiene generalmente con los subproductos pesqueros. Motivo por el que el proceso hidrolítico pudo haber sido diferente ocasionando menor ruptura en los enlaces peptídicos. Sin embargo, la gran diferencia de este ensilaje ácido pudo deberse a su alto contenido de quitina, que en el caso de su proceso de hidrólisis y comportamiento bajo este tipo de tratamiento y conservación hay poca información que nos permita discutir más a fondo.

Por otro lado, el contenido de quitina aumentó relativamente después del proceso, en comparación con el grillo seco utilizado como punto de referencia. Esta diferencia se explica por el proceso de hidrólisis, es decir a la ruptura de enlaces peptídicos que dan lugar a una molécula de agua (Pacheco-Gómez *et al.*, 2021), y que para fines de este trabajo el agua fue evaporada posteriormente al secar el producto aumentando el contenido relativo de la quitina y grasa cruda en el EAHG.

El proceso de extracción de quitina se basa en dos procedimientos principales, uno ácido y después un alcalino (Kandile *et al.*, 2018; Younes & Rinaudo, 2015). Ya que el ensilaje llevaba un proceso de hidrólisis ácida, tenía una mayor ventaja de extracción y no necesariamente se trata de que la quitina hubiera cambiado su conformación.

La disminución de la calidad del ensilaje ácido en subproductos pesqueros se puede atribuir a un exceso del proceso de hidrolizado, que dependen del tiempo y condición de

almacenamiento ya que Espe *et al.* (1989) observaron que después de 90 días ocurría una desaminación en el ensilaje a partir del tiempo inicial, la cual fue aún mayor a los 180 días. Por tanto, los ensilajes ácidos tienen la ventaja de tener una mayor hidrólisis de proteína en la dieta la cual puede absorberse eficientemente mejor hasta cierto punto (Espe *et al.*, 1992). Sin embargo, en el caso del grillo esto no puede tratarse de la misma manera ya que su comportamiento viscoso podría haber sido causado por la quitina y no por la cantidad de agua. No obstante, se puede decir que el incremento relativo de la quitina y grasa se debió al desplazamiento de agua por hidrólisis durante las 6 semanas. Siendo mucho menor tiempo al reportado por los autores antes mencionados.

El EAHG debió de alguna manera incrementar el nivel de absorción de aminoácidos con relación al tratamiento control. Sin embargo, a medida que se fue agregando el EAHG a la dieta, el desempeño del camarón (*L. vannamei*) fue disminuyendo. Esto no necesariamente implica que no estuviera lo suficiente hidrolizado, si no que el nivel de proteína disponible era menor en este ensilaje. De hecho, el análisis del perfil de aminoácidos entre los tratamientos no resultó en diferencias. Aunque existan algunas tendencias de disminución, las diferencias entre ellos son mínimas, por lo que no se puede asumir que la causa en el bajo crecimiento se debió a la deficiencia de algún aminoácido (Constant *et al.*, 2019). A pesar de que, por lo general el contenido de aminoácidos es relativamente semejante entre las especies de insectos (Da Silva Lucas *et al.*, 2020). De acuerdo con Bosch *et al.* (2014) las pupas de mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*), mosca domestica (*Musca domestica*) y larvas de gusano morio (*Zophobas morio*) contienen mayor porcentaje de metionina, lisina y fenilalanina a las de las especies de gusano amarillo de la harina (*Tenebrio molitor*), la larva de gusano de la harina (*Alphitobius diaperinus*), la cucaracha de seis manchas (*Eubladerus distantii*), la cucaracha cabeza de muerte (*Blaberus craniifer*) y la cucaracha argentina (*Blaptica dubia*). Además, estos autores mencionan que el grillo *Acheta domesticus* es la especie con menor contenido de arginina. Sin embargo, con relación a las dietas aquí presentes no se demostraron diferencias, lo que implica que esto no fue una limitante.

Por lo anterior, tampoco hubo diferencias en la digestibilidad aparente de los camarones alimentados con las dietas experimentales, encontrándose todas por arriba del

70% de digestibilidad en materia seca. Por lo que no se puede argumentar que la digestibilidad hubiese sido la causa del bajo crecimiento observado.

A diferencia de los aminoácidos esenciales que no varían tanto entre tratamientos por la manera en que se sintetizan las proteínas del organismo, los ácidos grasos reflejan de manera directa el contenido de estos con respecto a las dietas, aunque también pueden ser sintetizados de acuerdo, a la capacidad del organismo (Lima & Figueiredo-Lima, 2016). Los ácidos grasos son indispensables para la formación y estabilidad de la membrana lipídica además de ser una fuente de energía. En los resultados obtenidos de los análisis de tejido muscular y hepatopáncreas se observan ciertas diferencias. Vale la pena mencionar que el tejido muscular del camarón (*L. vannamei*) es bastante magro conteniendo entre 1.5 a 1.7% de grasa cruda entre los tratamientos, por lo que los ácidos grasos contenidos no deberían presentar grandes cambios. Sin embargo, el 16:0, 16:1 y 20:4n6 (ARA) disminuyeron conforme se agregó mayor ensilaje ácido hidrolizado de grillo mientras que el 18:2n6 (linoleico) disminuye.

En cambio, en el hepatopáncreas siendo el órgano involucrado en el metabolismo de las reservas (con 21 a 28% de grasa cruda) y en donde más cambios y acumulación de grasa puede observarse, se obtuvieron mayores cambios como era de esperarse a pesar de que el índice hepatosomático no presentó diferencias significativas. Conforme se agregó el EAHG en las dietas. Se observaron disminuciones en el 16:0 (de 24.4 a 17.9%), ARA (5.4 a 0.76%) y DHA (de 5.7 a 2.4%), mientras que aumentaron el 18:1n9 (de 28 a 42%), 18:2n6 (de 17 a 38%), 18:3n3 (de 1.12 a 2.3%) y EPA (0.23 a 0.48%). Cambios que muestran la misma tendencia al contenido de las dietas.

Generalmente, el contenido de ácidos grasos en el organismo refleja las cantidades que se presentan en las dietas (Shefat, 2018). En general los insectos, carecen de ácidos grasos esenciales LC-PUFA (i.e, DHA, EPA, ARA) y en particular *A. domesticus* (Mariod *et al.*, 2017). Por esta razón es que las dietas fueron formuladas con aceite de microalgas ricas en DHA y EPA, aunque no con ARA. Sin embargo, la adición del aceite de microalgas no fue suficiente como para mantener el DHA al mismo nivel entre tratamientos. Diversos autores (Duan *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2017) coinciden en que el requerimiento de ARA en camarón (*L. vannamei*) es del 0.8% o superior en la dieta. Este trabajo a pesar de que se

disminuyó el ARA conforme el EAHG se agregó a las dietas en músculo y hepatopáncreas también disminuyó, aunque sí alcanzó valores relativamente mayores. Probablemente a causa de la disminución de otros ácidos grasos usados como fuentes de energía. Sin embargo, el EPA (20:5n3) en las dietas se mantuvo a un nivel constante, mientras que en el hepatopáncreas hubo un aumento relativo, aunque no a niveles superiores a 0.5%, por lo que no puede asumirse que haya sido un factor que inhibió el crecimiento (Duan *et al.*, 2021).

A pesar de que no hubo cambios en la ingesta de alimento entre los tratamientos (4.2 a 5.2% de consumo diario con relación a su peso), se podría pensar que la palatabilidad pudo ser un factor que los llevó a un menor consumo por el contenido de ácido (cítrico/fosfórico), en el supuesto de que la ingestión de los alimentos es un parámetro poco exacto. No obstante, en un estudio realizado por Forster *et al.* (2011) demostraron que los camarones *L. vannamei* alimentados con variantes de hidrolizados ácido y ácido neutralizado de subproductos de pescado, resultaron en un menor crecimiento que su dieta control formulada con harina de pescado. Es necesario establecer que dichos autores reemplazaron el 50% de la harina de pescado por las variantes de ensilaje de pescado en sus respectivas modalidades (ácido y neutralizado). Resultados que no concuerdan con lo reportado anteriormente por Espe *et al.* (1992), donde un 50% de ensilaje ácido de subproductos pesqueros reemplazó a la harina de pescado en las dietas, lo que resultó en un mejor crecimiento que aquellos sin reemplazo. Este resultado podría sugerir que el intestino de camarón *L. vannamei* al ser más corto, no tenga la capacidad de absorción suficiente. Sin embargo, no se puede especular sobre este punto sin tener las evidencias.

Uno de los procedimientos para evaluar el estado de salud de los organismos acuáticos como el camarón *L. vannamei* ya sea a través de la cuantificación de la bioquímica de ciertos compuestos presentes en la hemolinfa (Del Rio Zaragoza *et al.*, 2021, López-Ortiz *et al.*, 2023, Pintor *et al.*, 2022). En este trabajo no se encontraron diferencias en los niveles de proteína total y colesterol, Sin embargo, en glucosa se observaron diferencias, donde el nivel más bajo se encontró en el tratamiento D-Medio, mientras que el resto de los tratamientos los valores de mg/dL fueron significativamente similar. No obstante, los niveles de ambos grupos significativos no muestran estar en los límites que pudieran mostrar signos de estrés o menor salud (Chen *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Mykles, 2011; Pascual *et al.*, 2003;

Song *et al.*, 2003). Por lo anterior se puede decir que los camarones al alimentarse con distintos niveles de EAHG, no presentaron cambios aparentes en su salud.

Por lo anterior expuesto, se puede decir que la inclusión de EAHG en las dietas del presente estudio resultó en un menor crecimiento debido a la sobreestimación de la proteína disponible a consecuencia de que los grillo se encontraban subalimentados.

Si bien la quitina pudiera tener algunas características beneficiosas (Barroso *et al.*, 2014; Bosch *et al.*, 2014) como antioxidantes o moduladores del microbioma, en este trabajo no se registró ningún efecto benéfico, quizás por estar enmascarados con la cantidad de proteína disponible.

Al calcular la proteína cruda al formular las dietas, es importante conocer el contenido exacto de quitina para no alejarse del valor de proteína disponible. En principio, la proteína se reporta como proteína cruda, precisamente por no considerarla como disponible ya que está sujeta a ligeros cambios en la estimación de proteína dentro de cada uno de los ingredientes utilizados en la formulación. Pero cuando existe la presencia de altas cantidades de nitrógeno no proteico (NNP), es importante verificar y hacer los ajustes correspondientes para estimar la proteína que estará disponible en el alimento. Barroso *et al.* (2014) y Bosch *et al.* (2014) reportaron que los insectos contribuyen entre el 1 al 7% de nitrógeno (N) de todo su cuerpo, no obstante, otros autores (Jonas-Levi & Martínez, 2017) reportaron que entre el 15 al 30% de contenido de quitina está presente en los insectos. Diferencias que nos lleva a un mayor problema al incluir a los insectos en niveles que puedan afectar el contenido de proteína disponible. Esta diferencias en el contenido de quitina, si bien se debe a las diferencias entre especies, también depende del índice de condición alimentaria que seguramente está influyendo, como lo fue en este trabajo. Lo anterior se basa en que *A. domesticus* se reportó con un 26% de quitina y 12% de nitrógeno no proteico (NNP), indicando que los organismos estaban subalimentados.

Es por ello, la importancia en determinar el contenido de nitrógeno proteico (NP) del NNP al usar al grillo como materia prima, ya que puede producir una sobreestimación de la proteína en las dietas.

VIII. CONCLUSIONES

El grillo puede ser conservado con una mezcla de ácidos para ser almacenados sin necesidad de refrigeración o secado, por lo que da lugar a la disminución de la huella de carbono.

Durante la hidrólisis hay generación de agua en el producto hidrolizado por lo que las seis semanas de conservación dio lugar a un incremento aparente en el contenido de quitina y grasa.

El bajo crecimiento encontrado en las dietas con ensilaje ácido hidrolizados de grillo (EAHG) no puede atribuirse a la baja digestibilidad de éste, sino a la sobrevaloración del nitrógeno proteico, al encontrar un exceso de quitina.

Debido al exceso de quitina en el grillo, la cantidad de proteína disponible en las dietas disminuyó conforme aumento la inclusión del EAHG, resultando en un efecto directo en la reducción del crecimiento.

El perfil de ácidos grasos contenido en el músculo y hepatopáncreas representan lo contenido en las dietas, aun cuando existe el indicio de que el 18:2n6 (linoleico) es eficientemente utilizado al tener valores relativamente menores a lo contenido en las dietas, mientras que el 18:1n9 se acumula significativamente, alcanzando niveles mayores al contenido en las dietas experimentales.

El EAHG no es una alternativa de sustitución de harina de pescado para las dietas en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*.

IX. RECOMENDACIONES

Tener conocimiento de la línea genética del laboratorio de los camarones para no tener un margen de error en rendimiento.

Evaluar el contenido de quitina de la materia prima para no sobreestimar el % el nitrógeno proteico del NNP.

Eliminar el nitrógeno no proteico (NNP) para no sobreestimar el porcentaje de proteína en las dietas formuladas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Moreno M., Martínez-Sánchez I., Rodríguez-Ortega A., San Juan-Lara J., Ventura-Maza A. & Sánchez-Reyes U. J. (2019). La chicha como insecto comestible (Coleóptera: *Cerambycidae*) en la región de la vega de Metztlán, Hidalgo. *Entomología Mexicana*. 6: 82-86. https://www.researchgate.net/profile/Itzcoatl_Martinez-Sanchez/publication/333782975
- Afreen M., & Ucak I. (2020). Fish processing wastes used as feed ingredient for animal feed and aquaculture feed. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*. 6(2): 55–64. <https://doi.org/10.18331/sfs2020.6.2.7>
- Ahuja I., Daukšas E., Remme J. F., Richardsen R., & Løes A. (2020). Fish and fish waste-based fertilizers in organic farming – With status in Norway: A review. *Waste Management*. 115: 95–112. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.025>
- Al-Rooqi M. M., Hassan M. M., Moussa Z., Obaid R. J., Suman N. H., Wagner M. H., Natto S. S., & Ahmed S. A. (2022). Advancement of chitin and chitosan as promising biomaterials. *Journal of Saudi Chemical Society*. 26(6): 101561. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101561>.
- Amador A., Tinajero A., Viana M.T. & Braga A. (2022). Use of threonine fermentation biomass as an alternative replacement of fishmeal in fish free diets for *Litopenaeus vannamei* juveniles: The effect on growth performance and apparent digestibility. *Aquaculture Research*. (53)7: 2970-2974.
- Anaya R. R. E. (2005). Cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone (1931) en sistema cerrado a alta densidad [Tesis de Maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 45pp.
- AOAC. (2015). AOAC: Official Methods of Analysis International. Borrow, and Streaming. *Oficial methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed. vol. 1. <https://archive.org/details/gov.law.aocac.methods.1.1990>
- Araújo B.C., Flores-Gálvez K., Honji R.M., Barbosa V.M., Viana M.T., Tinajero A. & Mata-Sotres J.A. (2020). Arachidonic acid effects on the overall performance, fatty acid

- profile, hepatopancreas morphology, and lipid-relevant genes in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 523: 1-14. Doi 10.1016/j.aquaculture.2020.735207
- Arredondo F. J. L. (2002). El cultivo de camarón en México, actualidades y perspectivas. *ContactoS*. 43:41–54. <https://cesasin.mx/wp-content/uploads/2017/12/Cam-Actualidades-en-el-cultivo-de-camaro%CC%81n.pdf>
- Ayisi C. L., Hua X., Apraku A., Afriyie G., & Kyei B. A. (2017). Recent Studies toward the development of practical diets for shrimp and their nutritional requirements. *Hayati Journal of Biosciences*. 24(3):109–117. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.09.004>
- Backhoff H. P. (1976). Some chemical changes in fish silage. *International Journal of Food Science & Technology*. 11(4): 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00734.x>
- Barroso F. G., De Haro C., Sánchez-Muros M. J., Venegas E. M., Martínez-Sánchez A., & Rojo S. (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*. 422(423): 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.024>
- Bernales M. M. del C. (2020). Development of an air pollutant emission control system for the Fishmeal Industry in Peru. [Tesis de Maestría]. Universidad de Barcelona, España. 40pp. Disponible en: <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/179081>
- Bosch G., Zhang S., Oonincx D., & Hendriks W. H. (2014). Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of Nutritional Science*. 3 (29): 1-4. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.23>
- CONAFAB. (2021). La industria alimentaria de animal en México. Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal A. C. (CONAFAB). Cd. de México. México. 100p.
- Constant M., Rios A., Lefebvre T., Do H., Henry M., & Jintasataporn O. (2019). Replacing Fish Meal with Defatted Insect Meal (Yellow Mealworm *Tenebrio molitor*) Improves the Growth and Immunity of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animals*. 9(5): 258. <https://doi.org/10.3390/ani9050258>
- Chen Y., Chi S., Zhang S., Dong X., Tan B., Liu H., Tan B., & Xie S. (2021). Effect of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on lipid and glucose metabolism of Pacific

- white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *British Journal of Nutrition*. 128(9): 1674–1688.
<https://doi.org/10.1017/s0007114521004670>
- Cho J. H., & Kim I. H. (2011). Fish meal nutritive value. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 95(6): 685–692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Da Rocha M., Alemán A., Baccan G. C., López-Caballero M. E., Gómez-Guillén C., Montero P., & Prentice C. (2018). Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Effects of Underutilized Fish Protein Hydrolysate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 27(5): 592–608. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1461160>
- Da Silva Lucas A. J., De Oliveira L. M., Da Rocha M., & Prentice C. (2020). Edible insects: An alternative of nutritional, functional, and bioactive compounds. *Food Chemistry*. 311: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodD-Controlhem.2019.126022>
- Del Rio-Zaragoza O. B., De Araújo B. C. P. O., & Viana M. T. (2021). Health status evaluation of striped bass (*Morone saxatilis*) exposed to low temperature in sea cage culture during the grow-out. *Aquaculture Research*. 52(6): 2435–2445.
<https://doi.org/10.1111/are.15093>
- Duan Y., Lu Z., Zeng S., Dan X., Zhang J., & Li Y. (2021). Effects of dietary arachidonic acid on growth, immunity, and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* under microcystin-LR stress. *Aquaculture*. 549: 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737780>
- Egerton S., Wan A., Murphy K., Collins F., Ahern G., Sugrue I., Busca K., Egan F., Muller N., Whooley J., McGinnity P., Culloty S., Ross R. P., & Stanton C. (2020). Replacing fishmeal with plant protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets by supplementation with fish protein hydrolysate. *Scientific Reports*. 10(4194):1-16.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60325-7>
- Espe M., Raa J., & Njaa L. R. (1989). Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 49(3): 259–270.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490302>
- Espe M., Haaland H., Njaa L. R., & Raa J. (1992). Growth of young rats on diets based on fish silage with different degrees of hydrolysis. *Food Chemistry*. 44(3): 195-200
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90187-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90187-7)

- Fagbenro O. A., & Jauncey K. (1993). Chemical and nutritional quality of raw, cooked, and salted fish silages. *Food Chemistry*. 48(4): 331-335. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90313-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90313-5)
- FAO. (1986). The production of fish meal and oil. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Fishery Industries Division. Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/x6899e/X6899E00.HTM>
- FAO. (2009). *Penaeus vannamei*. Cultured Aquatic Species Information Program. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Aquaculture and Fish Office. Roma, Italia, 15pp.
- FAO. (2010). The state of world fisheries and aquaculture. In Fisheries and Aquaculture Department (Ed.), *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). www.fao.org
- FAO. (2021). Looking at edible insects from a food safety perspective: Challenges and opportunities for the sector. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/cb4094en/cb4094en.pdf>
- FAO. (2022). The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). Towards blue transformation. Rome, Italy. 266 pp. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Fattah M. A. & El-Sayed A. M. (2020). Tilapia culture: Intensive culture. 2nd edition. *Academic Press*. 103–134 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816509-6.00006-9>
- Fines B. C., & Holt G. J. (2010). Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*. 303(4): 34–39. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.03.010>
- Forster I. C., Bechtel P. J., Dominy W. G., Lane S., Avena R., Ju Z. Y., & Conquest L. (2011). Use of Fish Hydrolysates and Fish Meal Byproducts of the Alaskan Fishing Industry in Diets for Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*. 73(3): 288–295. <https://doi.org/10.1080/15222055.2011.598371>
- Fox J., Treece d. G. & Sanchez D. (2012). Nutrición y manejo del alimento: Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica. Texas A&M University. Texas, USA. 65-90pp.

- Friedlingstein P., Sullivan M. O., Jones M. W., Liu Y., Gregor L., Hauck J., Quéré C. L., Van Der Laan-Luijkx I. T., Olsen A., Peters G. P., Peters W., Pongratz J., Schwingshackl C., Sitch, S., Canadell J. G., Ciais P., Jackson R. B., Alin S. R., Alkama R., Zheng B. (2022). Global Carbon Budget 2022. *Earth System Science Data*. 14(11): 4811–4900. <https://doi.org/10.5194/essd-14-4811-2022>
- García R. G. A., Valdez G. L. J. & López T. S. (2022). Inocuidad alimentaria en la entomofagia: Chapulines (Orthóptera) de Oaxaca, México. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria*. 28(4): 1-9. https://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC-D-22-0020._Manuscrito_final.pdf
- Henry M., Gasco L., Piccolo G., & Fountoulaki E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology*. 203(1): 1–22. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2015.03.001>
- Hleap Z. J. I., & Gutiérrez C. C. A. (2017). Hidrolizados de pescado-producción, beneficios y nuevos avances en la industria. *Acta Agronómica*. 66(3): 311-322 <https://doi.org/10.15446/acag.v66n3.52595>
- Ho I., Peterson A., Madden J., Huang E., Amin S., & Lammert A. (2022). Will It Cricket? Product Development and Evaluation of Cricket (*Acheta domesticus*) Powder Replacement in Sausage, Pasta, and Brownies. *Foods*. 11(19): 3128. <https://doi.org/10.3390/foods11193128>
- Hua K., Cobcroft J. M., Cole A., Condon K., Jerry D. R., Mangott, A., Praeger C., Vucko M. J., Zeng C., Zenger K., & Strugnell J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*. 1(3): 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- IFFO. (2022). Annual Report Global Fish Market. IFFO: The Marine Ingredients Organisation. London, U.K. 475 pp. <https://www.researchandmarkets.com/reports/5546200/global-fish-meal-market-size-forecast-2022>
- Igual M., García-Segovia P., & Martínez-Monzó J. (2020). Effect of *Acheta domesticus* (house cricket) addition on protein content, colour, texture and extrusion parameters of extruded products. *Journal of Food Engineering*. 282: 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110032>

- INAPESCA. (2018). Acuacultura: Camarón blanco del Pacífico. Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). 1: 1–11. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Janssen R. M. J., Vincken J., Van Den Broek L., & Fogliano V. (2017). Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(11): 2275–2278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>
- Jave N. J., Esenarro D., Rodríguez C., Espinel P. V., Cabrera C. C. F., & López B. J. (2020). Pollution of coastal waters by effluente from the fish meal industry in the bay of Malabrigo-Trujillo, Perú. *Journal of Critical Reviews*. 7(15): 6205–6211.
- Jonas-Levi A., & Martinez J. I. (2017). The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. *Journal of Food Composition and Analysis*. 62: 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.004>
- Jones A. Y., Alleway H. K., McAfee D., Reis-Santos P., Theuerkauf S. J., & Jones R. (2022). Climate-Friendly Seafood: The Potential for Emissions Reduction and Carbon Capture in Marine Aquaculture. *BioScience*. 72(2): 123–143. <https://doi.org/10.1093/biosci/biab126>
- Kandile N. G., Zaky H. T., Mohamed M. I., Nasr A. S., & Ali Y. G. (2018). Extraction and Characterization of Chitosan from Shrimp Shells. *Open Journal of Organic Polymer Materials*. 08(03): 33–42. <https://doi.org/10.4236/ojopm.2018.83003>
- Kono M., Matsui T., & Shimizu C. (1987). Effect of chitin, chitosan, and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. *Nippon Soisan Gakkaishi*. 53(1): 125–139.
- Li X., Chen Y., Chen X., Zhang S., Dong X., Chi S., Junming D., Tan B., & Xie S. (2022). Cholesterol supplementation improved growth performance, cholesterol metabolism, and intestinal health of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed a low fishmeal diet. *Aquaculture Reports*. 27:1-13 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101351>
- Lima R. & Figueiredo-Lima D. F. (2016). Critical Review: Essential Fatty Acids on Shrimp Feeding. *Scientia Agraria Paranaensis*. 15(3): 236-243. [tps://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n3p236-243](https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n3p236-243)

- López L. M. & Viana M. T., (1995). Determination of the quiality of food elaborated from unheated and heated fish silajes for abalone juveniles of *Haliotis fulgens*. *Ciencias Marinas*. 21(3): 331-342. <https://doi.org/10.7773/cm.v21i3.994>
- López-Ortiz E., Arambul-Muñoz E., Tinajero A., Del Rio-Zaragoza O. B., Galindo-Valdez L. A., & Viana M. T. (2023). Effect of substitution of poultry by-product meal by bovine by-product meal on overall performance for *Litopenaeus vannamei*. *Animal Feed Science and Technology*. 303: 1-12 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115689>
- MacLeod M. C., Hasan M. K., Francis R. D. H., & Mamun-Ur-Rashid M. (2020). Quantifying greenhouse gas emissions from global aquaculture. *Scientific Reports*.10(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68231-8>
- Mariod A. A., Mirghani M. E. S., & Hussein I. (2017). *Acheta domesticus* House Cricket chapter 48th. *Academic Press*. 323–325pp. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809435-8.00048-2>
- Martin A. J. (2007). Composting of seafood wastes (chapter 23rd). *Maximising the Value of Marine By-Products*. Edit. Woodhead Publishing. 486–515pp. <https://doi.org/10.1533/9781845692087.3.486>
- Martínez-Antonio E. M., Racotta I. S., Ruvalcaba-Márquez J. C., & Magallón-Barajas F. (2019). Modulation of stress response and productive performance of *Litopenaeus vannamei* through diet. *PeerJ*. 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.6850>
- Mata-Sotres J. A., Tinajero-Chavez A., Barreto-Curiel F., Pares-Sierra G., Del Rio-Zaragosa O. B., Viana M. T., & Rombenso A. N. (2018). DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in *Totoaba macdonaldi* fish oil-free feeds containing poultry by-product meal and beef tallow. *Aquaculture*. 497:440- 451. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.015.
- Mercier L., Palacios E., Campa-Córdova N. I., Tovar-Ramírez D., Hernández-Herrera R., & Racotta I. S. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*. 258(1–4): 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.036>
- Montaño-Vargas J., Shimada A. S., Vásquez C., & Viana M. (2002). Methods of measuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*. 213(1–4): 339–346. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00020-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00020-0)

- Mustăţea G., Ungureanu L. E. & Iorga E. (2019). Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food -progress over time: a short review. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 26: 81-87. <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20193332600>
- Mykles D. L. (2011). Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127: 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.09.001>
- NRC. (2001). Nutrient requirements of fish and shrimp. *The national academies press*. Washintong, DC. USA. 376pp.
- Pacheco-Gómez V., Caballero-Zamora A., Martínez-González S., Prado-Rebolledo Omar & García Casillas A. (2021). Biochemistry and metabolic pathways of polysaccharides, lipids, and proteins. *Abanico Veterinario*. 11:1-26. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.47>
- Pan J., Xu H., Cheng Y., Mintah B. K., Dabbour M., Yang F., Chen W., Liu H., Dai C., He R., & Ma H. (2022). Recent Insight on Edible Insect Protein: Extraction, Functional Properties, Allergenicity, Bioactivity, and Applications. *Foods*, 11(19), 2931. <https://doi.org/10.3390/foods11192931>
- Parrish C. C., Nichols P. D., Pethybridge H., & Young J. W. (2015). Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia*. 177(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/S00442-014-3131-3/TABLES/1>
- Pascual C. Y., Gaxiola G., & Rosas C. (2003). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*. 142(4): 735–745. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0995-2>
- Peh K. L., Shapawi R., & Lim L. S. (2021). Black cricket (*Gryllus bimaculatus*) meal as a protein source in the practical diets for juvenile whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 20(3): 731–740. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2021.124045>
- Perera G. L., & Bhujel R. C. (2022). Replacement of fishmeal by house cricket (*Acheta domesticus*) and field cricket (*Gryllus bimaculatus*) meals: Effect for growth,

- pigmentation, and breeding performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture Reports*. 25: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101260>
- Pintor I., Mata-Sotres J. A., Rodríguez-Hernández A., Del Rio Zaragoza O., Viana M.T. & Vazquez-Duhalt R. (2022). Ingestion Effect of Polyethylene Terephthalate (PET) Nanoparticles on Juveniles of Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Applied Ecology and Environmental Sciences*. 10(3): 113-121. doi: 10.12691/aees-10-3-6
- Piper D. W., & Fenton B. H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*. 6(5): 506–508.
<https://doi.org/10.1136/gut.6.5.506>
- Richardson A. D., Dantas-Lima J., Lefranc M., & Walraven M. (2021). Effect of a Black Soldier Fly Ingredient on the Growth Performance and Disease Resistance of Juvenile Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animals*. 11(5):1-11
<https://doi.org/10.3390/ani11051450>
- Rodríguez-González H., Orduña-Rojas J., Villalobos-Medina J. P., García-Ulloa, M., Polanco-Torres A., López-Álvarez E. S., Montoya-Mejía M., & Hernández-Llamas A. (2014). Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Applied Phycology*. 26(6): 2453–2459. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0272-z>
- Sánchez-Muros M. J., Renteria P., Vizcaíno A., & Barroso F. G. (2020). Innovative protein sources in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding. *Reviews in Aquaculture*. 12(1): 186–203. <https://doi.org/10.1111/raq.12312>
- Schuster R. D. (1988). Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 431: 271–284. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)83096-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)83096-0)
- Shefat S. H. T. (2018). Nutritional Fish Disease and Public Health Concern. *Poultry Fisheries & Wildlife Sciences*. 06(02). <https://doi.org/10.4172/2375-446x.1000199>
- Shepherd C. J., & Jackson A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: Inputs, outputs, and markets. *Journal of Fish Biology*. 83(4): 1046–1066. <https://doi.org/10.1111/jfb.12224>

- Shiau S., & Yu Y. (1998). Chitin but Not Chitosan Supplementation Enhances Growth of Grass Shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Nutrition*. 128(5): 908–912. <https://doi.org/10.1093/jn/128.5.908>
- Shigemasa Y., & Minami S. (1996). Applications of Chitin and Chitosan for Biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 13(1): 383–420. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647935>
- Shin J., & Lee K. J. (2021). Digestibility of insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their performance for growth, feed utilization and immune responses. *PLoS ONE*. 16(11): 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260305>
- SINIA. (2011). Guía para el suministro de información al Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes - Industria de Harina de Pescado. Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA). Lima, Perú. 17pp. <https://www.minam.gob.pe/>
- Song Y., Yu C., Lien T., Huang C., & Lin M. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 14(4): 317–331. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0440>
- Stephenson R. L., & Smedbol R. K. (2001). Small Pelagic Species Fisheries. *Encyclopedia of Ocean Sciences*: 2nd Edition. 468–473pp. <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/3-s2.0-B9780123744739004471/first-page-pdf>
- Tadesse S., & Emire S. A. (2020). Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon*. 6(8):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04765>
- Tatterson I. N., & Windsor M. (1974). Fish silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 25(4): 369–379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740250404>
- Tilami S. K., Turek J., Červený D., Lepič P., Kozák P., Burkina V., Sakalli S., Tomčala A., Sampels S., & Mráz J. (2020). Insect meal as a partial replacement for fish meal in a formulated diet for perch *Perca fluviatilis*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 20(12): 867–878. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_12_03

- Valenzuela B. A., Sanhueza C. J. & de la Barra D. F. (2012). El aceite de pescado: Ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Rev. Chil Nutr.* 32(2): 201–209. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000200009>
- Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., & Vantomme P. (2013). Edible insects: Future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. <https://doi.org/978-92-5-107595-1>
- Viana M.T., Guzman J.M. & Escobar R. (2007). Effect of heated and unheated fish silage as a protein source in diets for Abalone *Haliotis fulgens*. *J. of the World Aquaculture Society*. 30(4):481-489. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00996.x>
- Vidotti R. M., Viegas E. M. M., & Carneiro D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*. 105(1–4): 199–204. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(03)00056-7)
- Xu H., Zhang Y., Luo K., Meng X., Luan S., Cao B., Chen B., Liang M., & Kong J. (2017). Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 479: 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.037>
- Younes I., & Rinaudo M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*. 13(3): 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Zhao L., Wang W., Huang X., Guo T., Wen W., Feng L., & Wei L. (2017). The effect of replacement of fish meal by yeast extract on the digestibility, growth, and muscle composition of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 48(1): 311–320. <https://doi.org/10.1111/are.12883>