



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de varias fuentes de proteína  
vegetal en dietas para el camarón  
*Litopenaeus vannamei***

Presentado por:  
César A. Molina Poveda

Dirigida por:  
Dr. Ing. Miguel Jover Cerdá

Valencia, Noviembre del 2015

## RESUMEN

El presente estudio fue diseñado para evaluar en ensayos independientes el efecto de reemplazar la proteína de la harina de pescado (HP) por cuatro fuentes de origen vegetal, altramuz (*Lupinus mutabilis* Sweet), gluten de maíz, amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Para esto se elaboraron cuatro series de dietas. Las dos primeras conteniendo 35% de proteína y 11% de lípidos fueron preparadas para sustituir el 0, 25, 50, 75 y 100% de la proteína proveniente de la HP por proteína de las harinas de altramuz (LKM) o gluten de maíz (CGM). Las otras dos series de dietas isoproteicas (30%) e isolipídicas (9,5%) fueron formuladas para reemplazar 0, 15, 25, 35 y 45% de la proteína de la HP por proteína de amaranto y quinua. Solamente los contenidos de almidón de maíz y aceite de pescado variaron para mantener constante los niveles de proteína y lípidos en todas las dietas experimentales. Todas las dietas tuvieron harina de calamar para proveer atractabilidad.

Dependiendo del ensayo realizado ocho (LKM y CGM) o siete (amaranto y quinua) juveniles de alrededor de 1g fueron sembrados aleatoriamente en los acuarios (44 ind. m<sup>-2</sup> o 39 ind. m<sup>-2</sup>) de 50 l equipados con un sistema de

recambio de agua de mar de flujo continuo. Seis acuarios (réplicas) fueron asignadas a cada uno de los tratamientos en un diseño completamente aleatorizado. Los camarones fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día por aproximadamente ocho semanas. Al final del ensayo de crecimiento, los camarones fueron alimentados con las dietas experimentales conteniendo 0,5% de óxido de cromo.

La supervivencia en general del estudio fue superior a 74% y no varió significativamente ( $p > 0,05$ ) cuando la HP fue reemplazada parcial o totalmente por cada una de las fuentes evaluadas.

Los resultados de este estudio mostraron que LKM puede reemplazar el 50% de la proteína de la HP sin disminuir significativamente ( $p > 0,05$ ) el crecimiento (6,7-7,0 g peso final). La inclusión de LKM en cualquiera de los niveles ensayados resultaron en una significativamente ( $p < 0,05$ ) reducción de la digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) y la digestibilidad aparente de proteína cruda (DAPC) del alimento.

El gradual incremento del CGM en las dietas produjo un significativo ( $p < 0,05$ ) decrecimiento del peso final (5,9 a 3,2 g) de los camarones y sus tasas de crecimiento (2,7 a 1,7%  $d^{-1}$ ) comparado a aquellos alimentados con 0 CGM (7,1 g y 3,0 %  $d^{-1}$ ). El Factor de Conversión Alimenticia

(FCA) fue también significativamente ( $p < 0,05$ ) afectado por el nivel de CGM, las dietas CGM50, CGM75 y CGM100 tuvieron un más alto FCA que CGM0 y CGM25. La inclusión de CGM en cualquier nivel ensayado resultó en un significativo decrecimiento en DAMS, de 77,9 a 66,0%, y en DAPC, de 80,5 a 52,0%, del alimento. La digestibilidad aparente de aminoácidos, con la excepción de lisina, declinó con la incorporación de CGM, reflejando la ADPC.

En tanto que los camarones alimentados con las dietas a base de amaranto mostraron ( $p < 0,05$ ) que la dieta con 15% de reemplazo obtuvo un mejor crecimiento después de la dieta control. Las dietas con reemplazo de 15% y 25% registraron significativamente ( $p < 0,05$ ) una mejor DAMS (79,70% y 71,21%) y DAPC (88,39% y 81,10%) que las dieta con 35% y 45% de sustitución. El reemplazo de la quinua en cualquiera de los niveles evaluados no demostraron tener un rendimiento ( $p < 0,05$ ) inferior a la dieta control. La DAMS y DAPC para las dietas con quinua fueron estadísticamente superiores ( $p < 0,05$ ) a la dieta control.

Estos resultados muestran que el altramuz y quinua tienen un potencial muy bueno como fuente proteína hasta el 50% y 45% respectivamente de la proteína de la HP lo cual es equivalente a un tercio del total de la

proteína presente en la dieta. El costo-beneficio de incluir estos ingredientes necesita ser evaluado. Los valores más bajos del gluten de maíz y amaranto relativo a la HP podrían ser debido a la baja digestibilidad de la proteína, imbalance de aminoácidos y/o a la presencia de factores antinutricionales.

## RESUM

El present estudi va ser dissenyat per a avaluar en assajos independents l'efecte de reemplaçar la proteïna de la farina de peix (HP) per quatre fonts d'origen vegetal, tramús (*Lupinus mutabilis* Sweet), gluten de dacsca (CGM), amarant (*Amaranthus caudatus* L.) i quinoa (*Chenopodium quinoa*) sobre el creixement de gambetes juvenils *Litopenaeus vannamei*. Per a açò es van elaborar quatre sèries de dietes. Les dos primeres contenint 35% de proteïna i 11% de lípids van ser preparades per a substituir el 0, 25, 50, 75 i 100% de la proteïna provinent de la HP per proteïna de les farines de tramús (LKM) o CGM. Les altres dos sèries de dietes isoproteicas (30%) i isolipídicas (9,5%) van ser formulades per a reemplaçar 0, 15, 25, 35 i 45% de la proteïna de la HP per proteïna d'amarant i quinoa. Només els continguts de midó de dacsca i oli de peix van variar per a mantindre constant els nivells de proteïna i lípids en totes les dietes experimentals. Totes les dietes van tindre farina de calamar per a proveir atractabilitat.

Deponent de l'assaig realitzat huit (LKM i CGM) o set (amarant i quinoa) juvenils d'al voltant de 1g van ser sembrats aleatòriament en els aquaris (44 ind. m<sup>-2</sup> o 39 ind. m<sup>-2</sup>) de 50 l equipats amb un sistema de recanvi d'aigua de mar de flux continu. Sis aquaris (rèpliques) van

ser assignades a cada un dels tractaments en un disseny completament aleatorizado. Les gambetes van ser alimentats *ad libitum* dos vegades al dia per aproximadament huit setmanes. Al final de l'assaig de creixement, les gambetes van ser alimentats amb les dietes experimentals contenint 0,5% d'òxid de crom.

La supervivència en general de l'estudi va ser superior a 74% i no va variar significativament ( $p>0,05$ ) quan la HP va ser reemplaçada parcial o totalment per cada una de les fonts avaluades.

Els resultats d'este estudi van mostrar que LKM pot reemplaçar el 50% de la proteïna de la HP sense disminuir significativament ( $p>0,05$ ) el creixement (6,7-7,0 g pes final). La inclusió de LKM en qualsevol dels nivells assajats van resultar en una significativament ( $p<0.05$ ) reducció de la digestibilitat aparent de matèria seca (DAMS) i la digestibilitat aparent de proteïna crua (DAPC) de l'aliment.

El gradual increment del CGM en les dietes va produir un significatiu decreixement del pes final (5,9 a 3,2 g) de les gambetes i les seues taxes de creixement (2,7 a 1,7% d<sup>-1</sup>) comparat a aquells alimentats amb 0 CGM (7,1 g i 3,0 % d<sup>-1</sup>). El Factor de Conversió Alimentària (FCA) va ser també significativament ( $p<0.05$ ) afectat pel nivell de

CGM, les dietes CGM50, CGM75 i CGM100 van tindre un més alt FCA que CGM0 i CGM25. La inclusió de CGM en qualsevol nivell assajat va resultar en un significatiu decreixement en DAMS, de 77,9 a 66,0%, i en DAPC, de 80,5 a 52,0%, de l'aliment. La digestibilitat aparent d'aminoàcids, amb l'excepció de lisina, va declinar amb la incorporació de CGM, reflectint l'ADPC.

En tant que les gambetes alimentats amb les dietes a base d'amarant van mostrar que la dieta amb 15% de reemplaçament va obtindre un millor creixement després de la dieta control. Les dietes amb reemplaçament de 15% i 25% van registrar significativament una millor DAMS (79,70% i 71,21%) i DAPC (88,39% i 81,10%) que les dieta amb 35% i 45% de substitució. El reemplaçament de la quinoa en qualsevol dels nivells avaluats no van demostrar tindre un rendiment inferior a la dieta control. La DAMS i DAPC per a les dietes amb quinoa van ser estadísticament superiors a la dieta control.

Estos resultats mostren que el tramús i quinoa tenen un potencial molt bo com a font proteïna fins al 50% i 45% respectivament de la proteïna de la HP la qual cosa és equivalent a un terç del total de la proteïna present en la dieta. El cost-benefici d'incloure estos ingredients necessita ser avaluat. Els valors més baixos del gluten de



dacsa i amarant relatiu a la HP podrien ser degut a la baixa digestibilitat de la proteïna, imbalance d'aminoàcids y/o a la presència de factors antinutricionals.

## ABSTRACT

The present study was designed to evaluate in independent trials the effect of replace protein fishmeal (HP) by four plant sources, lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet), corn gluten (CGM), amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) on the growth of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. For this four sets of diets were developed. The first two containing 35% protein and 11% lipids were prepared to replace the 0, 25, 50, 75 and 100% of the protein from HP by protein lupine (LKM) or CGM. The other two series of isoproteic (30%) and isolipidic (9.5%) diets were formulated to replace 0, 15, 25, 35 and 45% protein HP by protein amaranth and quinoa. Only the contents of corn starch and fish oil were varied to maintain constant levels of protein and lipid in all the experimental diets. All diets had squid meal to provide attractability.

Depending on the test conducted eight (LKM and CGM) or seven (amaranth and quinoa) juveniles of about 1g were stocked randomly in aquariums (44 ind. m<sup>-2</sup> or 39 ind. m<sup>-2</sup>) 50 L equipped with a flow-through water system using full-strength seawater. Six aquariums (replicates) were assigned to each of the treatments in a completely randomized design. The shrimp were fed *ad libitum* twice a day for about eight weeks. At the end of the growth trial,

shrimp were fed experimental diets containing 0.5% of chromium oxide.

Overall survival in the study was higher than 74% and did not change significantly ( $p>0.05$ ) when HP was replaced partially or completely by each of the sources evaluated. The results of this study showed that LKM can replace 50% of the protein of HP without significantly ( $p>0.05$ ) reducing growth (6.7-7.0 g final weight). LKM inclusion in any of the tested levels resulted in a significantly ( $p<0.05$ ) reduced the apparent digestibility of dry matter (ADMS) and apparent digestibility of crude protein (ADPC) of the feed.

The gradual increase of CGM in diets produced a significant ( $p<0.05$ ) decrease of shrimp final weight (5.9 to 3.2 g) and growth rate (2.7 to 1.7%  $d^{-1}$ ) compared to those fed CGM 0 (7.1 g and 3.0%  $d^{-1}$ ). Feed Conversion Factor (FCA) was also significantly ( $p<0.05$ ) affected by CGM level, diets CGM50, CGM75 and CGM100 had higher FCA than CGM0 and CGM25. The inclusion of CGM on any level tested resulted in a significant decrease in ADMS, from 77.9 to 66.0%, and ADPC, 80.5 to 52.0%, of the feed. The apparent digestibility of amino acids, except lysine, declined with the addition of CGM, reflecting the ADPC.

While those shrimps fed diets based on amaranth showed that the diet with 15% replacement obtained a better growth ( $p < 0.05$ ) after the control diet. Diets with replacement 15% and 25% reported significantly ( $p < 0.05$ ) better DAMS (79.7% and 71.2%) and ADPC (88.4% and 81.1%) than the diet with 35% and 45% substitution. The replacement of quinoa in any of the assessed levels have not demonstrated performance ( $p < 0.05$ ) lower than the control diet. The DAMS and ADPC for quinoa diets were statistically superior ( $p < 0.05$ ) than control diet.

These results show that lupine and quinoa have a very good potential as a protein source up to 50% and 45% respectively of the HP protein which is equivalent to a third of the total protein in the diet. The cost-benefit of including these ingredients needs to be evaluated. Lower values of corn gluten and amaranth on the HP could be due to low protein digestibility, imbalance of amino acids and / or the presence of antinutritional factors.

## DEDICATORIA

A Dios por ser luz y guía constante de mi vida, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar ante las adversidades que se presentan.

Para mis padres Carlos Molina Pérez y Antonieta Poveda Muñoz por su apoyo, aliento, consejos, comprensión, inestimable amor y por enseñarme a perseverar a lo largo de mi formación profesional hasta la culminación de mis estudios reflejados en este estudio doctoral. Los quiero mucho.

A mi querida hermana Lourdes María por estar siempre presente, acompañándome.

A la memoria de mi querido hermano Renzo Patricio le dedico este trabajo

Con todo mi amor, a mi esposa Sonnya Patricia Mendoza Lombana por lo muy presente que ha estado en las largas horas de trabajo dedicadas al desarrollo de este estudio doctoral y por estar incondicionalmente conmigo durante estos años.

A mis queridos hijos Samir Augusto y Haziél André quienes son fuente de inspiración, por todo su amor y comprensión.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero resaltar, que este trabajo desarrollado es el fiel reflejo de los conocimientos y experiencia obtenidos en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), a quien debo mi eterna gratitud.

Además quiero expresar mi profundo agradecimiento:

De manera especial a mi Director de tesis, Dr. Miguel Jover Cerdá, por su profesional asistencia en la elaboración de ésta tesis así como toda la valiosa orientación y apoyo ofrecido durante todo mi proceso doctoral.

Así también deseo extender mi agradecimiento al Dr. David Smith, que contribuyó a los resultados de este estudio y al personal del CENAIM por su apoyo durante este estudio.

Por último, me gustaría expresar mi agradecimiento por el apoyo y la financiación en parte de este estudio, por la Fundación Internacional para la Ciencia y por la Cooperación Técnica de Bélgica

# INDICE DE CONTENIDOS

## CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

<b>1.0.- Introducción</b>	20
<b>1.1.- Requerimientos nutricionales del camarón</b>	24
1.1.1.- Proteína	24
a) <i>Aminoácidos</i>	29
1.1.2.- Lípidos	34
a) <i>Ácidos grasos esenciales</i>	35
b) <i>Fosfolípidos</i>	38
c) <i>Esteroles</i>	40
1.1.3.- Carbohidratos	43
a) <i>Utilización de hidratos de carbono</i>	43
b) <i>Digestibilidad de carbohidratos</i>	45
1.1.4.- Bioenergética	46
a) <i>Relación Proteína:Energía.</i>	47

<b>1.2.- Fuentes alternativas a la harina de pescado</b>	49
1.2.1.- Leguminosas	50
1.2.2.- Oleaginosas	53
1.2.3.- Productos derivados de granos y cereales	55
1.2.4.- Sub-productos avícolas	56
1.2.5.- Harinas de carne, hueso y sangre	57
1.2.6.- Fuentes vegetales no tradicionales.	58
a) <i>Altramuz</i>	58
b) <i>Gluten de maíz</i>	61
c) <i>Amaranto</i>	62
d) <i>Quinoa</i>	64
<b>1.3.- Objetivos</b>	66
1.3.1 General	66
1.3.2 Específicos	66
<b>1.4.- Hipótesis</b>	66



## **CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS**

<b>2.1.- Procesamiento del grano</b>	<b>67</b>
2.1.1.- Eliminación de alcaloides	67
2.1.2.- Extracción de aceite	67
2.1.3.- Remoción de la saponina de la quinua	67
<b>2.2.- Dietas experimentales</b>	<b>68</b>
<b>2.3.- Ensayo de crecimiento en el laboratorio</b>	<b>70</b>
<b>2.4.- Ensayo de crecimiento en campo</b>	<b>71</b>
<b>2.5.- Parámetros de rendimiento</b>	<b>72</b>
<b>2.6.- Estabilidad de dietas</b>	<b>72</b>
<b>2.7.- Tasa de ingestión</b>	<b>73</b>
<b>2.8.- Ensayo de digestibilidad</b>	<b>74</b>
<b>2.9.- Análisis bioquímicos</b>	<b>74</b>
<b>2.10.- Análisis estadístico</b>	<b>75</b>

## **CAPITULO III: RESULTADOS**

<b>3.1.- Evaluación del altramuz</b>	<b>76</b>
<b>3.2.- Utilización del gluten de maíz</b>	<b>111</b>
<b>3.3.- Evaluación del amaranto y quinua.</b>	<b>138</b>

## **CAPITULO IV: DISCUSION GENERAL**

<b>4.1.- Consumos y Factores Antinutricionales</b>	<b>167</b>
<b>4.2.- Aminoácidos y crecimiento</b>	<b>170</b>
<b>4.3.- Estabilidad de las dietas</b>	<b>173</b>
<b>4.4.- Utilización del alimento</b>	<b>175</b>

## **CAPITULO V**

<b>5.1.- Conclusiones y recomendaciones generales</b>	<b>179</b>
<b>5.2.- Referencias</b>	<b>180</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nivel óptimo de proteínas (porcentaje de alimento) de las especies de camarones.	27
<b>Tabla 2.</b> Niveles óptimos (porcentaje de proteína en la dieta) para EAA en algunas especies.	31
<b>Tabla 3.</b> Niveles óptimos de acidos grasos esenciales publicados para camarón.	37
<b>Tabla 4.</b> Niveles óptimos de fosfolípidos en diferentes especies de camarón.	39
<b>Tabla 5.</b> Niveles óptimos de colesterol de varias especies de crustáceos.	42
<b>Tabla 6.</b> Coeficiente de digestibilidad de varias fuentes de carbohidratos reportados en camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> .	46
<b>Tabla 7.</b> Relación óptima de proteína/energía dietaría en varias especies de camarones	48
<b>Tabla 8.</b> Contenido de aminoácidos (g/100g proteína) del <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet comparado con el gluten de maíz.	60
<b>Tabla 9.</b> Análisis proximal de harina de gluten de maíz comercial de 60% de PC.	61
<b>Tabla 10.</b> Contenido de aminoácidos (g/100g proteína) de amaranto, quinua comparado con harina de pescado.	64
<b>Tabla 11.</b> Formulación de las dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de la harina de pescado por altramuz.	68
<b>Tabla 12.</b> Formulación de las dietas experimentales con diferentes niveles de reemplazo de la harina de pescado por gluten de maíz.	69
<b>Tabla 13.</b> Formulación de las dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de la harina de pescado por amaranto y quinua.	69

# CAPITULO I

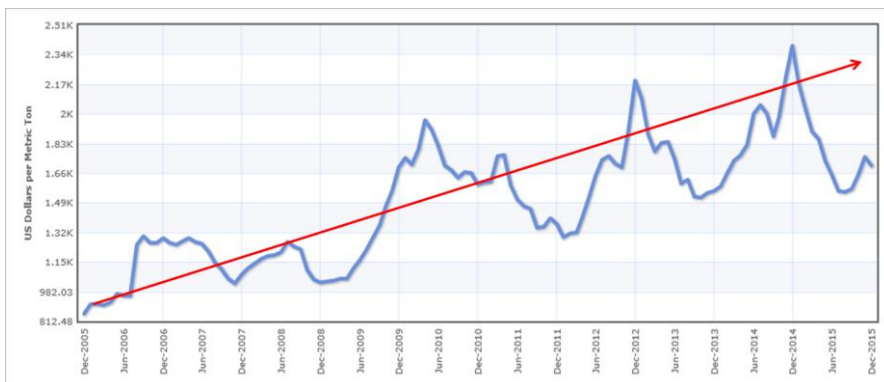
## 1.0.- Introducción

A medida que la población mundial sigue creciendo, también lo hace la necesidad del mundo por la alimentación, especialmente por las fuentes de proteína de alta calidad. Con la población mundial que a mediados del 2015 fue alrededor de 7,3 billones, y las previsiones de más de 8,5 billones en el 2030 (United Nations, 2015), el consumo de productos del mar en ese momento se prevé alcanzar 186 millones TM (Pauly y Froese, 2012). Sin embargo, debido a la disminución de las capturas de peces silvestres en gran parte debido a la insostenibilidad de la pesca industrializada, la acuicultura será llamada a llenar este vacío. En el 2014, se estimó que la producción global de peces creció a 164,3 millones TM esto es 1%, impulsadas por una expansión del 5% de la acuicultura que equivale a 74,3 millones TM, lo que compensa la contracción del 2% en la producción de peces silvestres a 90,0 millones TM (FAO, 2015). Esta contracción refleja principalmente la reducción de la capturas de anchoveta, relacionado al fenómeno climático de El Niño. Para el 2015 es probable que haya un pequeño repunte en la pesca a 90,6 millones TM, así como un mayor crecimiento del 5% de la producción acuícola de 78,0 millones TM.

Como resultado, la producción pesquera se prevé llegar a 168,6 millones de TM en 2015, un 2,6 % más respecto al 2014 (FAO, 2015). En concordancia con lo que se ha observado durante el último par de décadas, esto es la captura global de la producción pesquera ha sido estática en aproximadamente 90 millones TM por año (Pauly y Froese, 2012).

En 1988, la acuicultura utilizó aproximadamente el 10% de la producción total de harina de pescado (HP) de un total de 6.5 millones de TM, para alimentos (Tacon y Metian, 2009; Welch *et al.*, 2010). En 1990, aproximadamente el 30% de la captura total de peces fue convertido en HP y aceite de pescado para su uso en alimentos (Tacon, 1993). Más recientemente, en 2008 - 2009 la acuicultura explotó el 59% de la producción total mundial de HP, 5 millones de TM, y el 80% de la producción total de aceite de pescado (AP), del orden de 1 millón de TM (Jackson, 2012). La demanda global ha continuado creciendo, empujando los precios a máximos históricos en enero de 2013 de hasta U\$D 1919 / TM de HP 64-65%, un incremento del 206% con respecto a enero 2005 (FAO, 2014). Como también la página web [indexmundi](http://indexmundi.com) registra el incremento en precio de ésta HP para los últimos 10 años en Perú (Figura 1).

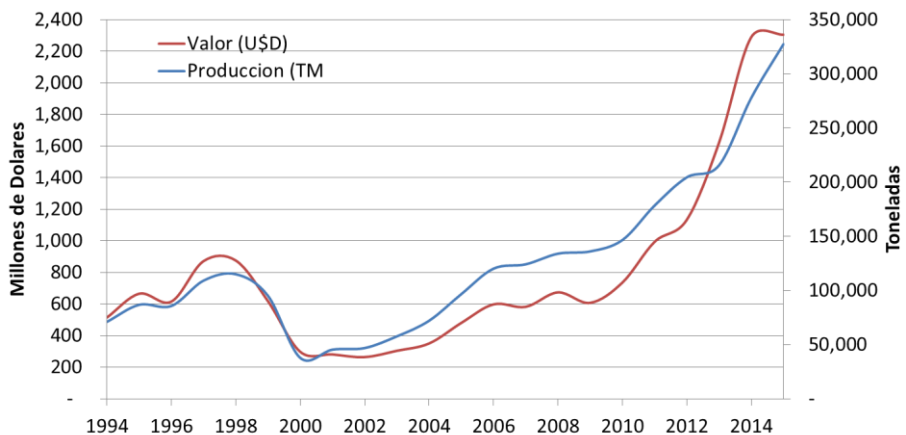
En 2022, alrededor del 16% de la producción de la pesca será reducida a HP y AP, debajo de 7% en promedio del 2010-12. Sin embargo, en 2022, el total de producción de HP y AP en su orden estará un 15% y 10% por encima del mismo período por el incremento y mejor uso de los peces de desecho y recortes. Esto supone pasar de 6 millones TM en el periodo 2010-12 a algo más de 7 millones TM para el 2022.



**Figura 1.** Precio mensual de HP 65% del Perú para el periodo 2005-2015. Fuente: [www.indexmundi.com](http://www.indexmundi.com)

En cuanto a la producción del camarón se volvió rentable desde la década de los 70 debido a la creciente demanda de éste crustáceo, lo cual ha estimulado continuamente su cría. Tailandia, Indonesia, China, India y otros países de Asia Sur-Oriental dedican 1,2 millones de hectáreas a la producción del camarón y cerca de 200 mil ha en el hemisferio occidental (Boyd y Clay, 1998). La acuicultura

del camarón es un componente importante en la economía de estos países intertropicales. En los últimos 20 años la producción de la acuicultura mundial del camarón se ha incrementado en 5,2 veces en peso y 3.8 veces en valor, el aumento de la producción mundial paso de 837.790 TM en 1991 a 4.327.520 TM en 2012, con valor estimado de U\$D 5,17 mil millones y U\$D 19,43 mil millones, respectivamente (FAO, 2014), lo que representó más de la mitad de los suministros mundiales de camarón. Ecuador también ha mostrado después del colapso de la industria por la presencia del síndrome del virus de la mancha blanca, un patrón ascendente en su exportación llegando a 325.000TM en el 2015 con un equivalente a U\$D 2.304.901.984 (Figura 2).



**Figura 2.** Exportación anual de camarón para el periodo 1994-2015.

Fuente: CNA (2016)

Según Chamberlain (1993), se necesita un crecimiento anual del 6,5% para satisfacer la demanda de productos del mar para el 2025. Para lograr este nivel de crecimiento (6,5%), se requerirá investigación y el desarrollo de las técnicas de producción con el fin de obtener los más eficiente, seguros y rentables métodos para la producción de peces y mariscos en la industria acuícola. Sin embargo de acuerdo a Brugère y Ridler (2004) si la tasa de expansión de China no continúa como la década de los 90 más bien un descenso es anticipado.

Entre las diferentes especies de camarones peneidos elegidos para la acuicultura, *Litopenaeus vannamei* toma la delantera como la especie dominante en todo el mundo.

## **1.1.- Requerimiento Nutricionales del camarón**

### **1.1.1.- Proteína**

Las proteínas son grandes y complejos compuestos de nitrógeno orgánico, que se encuentran en las células de todos los animales y plantas indispensables para el crecimiento y mantenimiento de la vida de todos los animales.

Los requerimientos de proteína deben ser cuidadosamente examinados ya que las especies en producción no poseen un requerimiento real de proteína, pero requieren una mezcla equilibrada de aminoácidos,



por lo tanto, los requerimientos nutricionales, expresados como porcentaje de la dieta, son influenciados por la fuente de proteínas, además de la edad y el estado fisiológico del animal, más la fuente de proteína utilizada en la dieta puede conducir a la sobreestimación de requerimiento de proteína (Mambrini y Guillaume, 2001).

Las proteínas son los componentes más importantes del cuerpo de los animales, que representan el 65-85% del peso de los peces y camarones (Bogard *et al.*, 2015) y su calidad está determinada por el perfil de aminoácidos esenciales (Velasco *et al.*, 2001). Dado que los peces y camarones tienen una capacidad limitada para sintetizar proteínas a una tasa que se requiere para promover el crecimiento máximo, por lo tanto, la proteína debe ser adquirida a través del alimento que se consume. Aunque en nutrientes cualitativos las necesidades básicas tiene similitudes entre los peces y los animales domésticos de granja, sin embargo la mayoría de especie de peces requiere dietas con alto contenido de proteínas.

En crustáceos, el nivel de proteína óptima se determina basándose en los datos de crecimiento con diferentes niveles de proteínas de la dieta proporcionada que se define como la cantidad mínima de este nutriente necesario para el crecimiento máximo. Algunos estudios demuestran que los camarones tiene un requerimiento de

proteína diario que puede ser cubierto con dietas con diferentes niveles de proteína así se puede esperar la misma cantidad de crecimiento cuando al camarón se le ofrece una dieta alta en proteínas a un nivel ración reducida en comparación con una dieta rica en proteínas inferior alimentado en un nivel superior (Kureshy y David 2002; Venero *et al.*, 2007). Los alimentos para camarón contienen generalmente entre 60% y 25% de PC. Algunas investigaciones de laboratorio, han demostrado amplias variaciones en el requerimiento reportado para el camarón por diferentes investigadores dentro de la misma especie y estado de desarrollo. Así, Pedrazzoli *et al.* (1993) establecieron un requerimiento para *L. vannamei* de 40%, Cousin *et al.* (1991) 30%, mientras que Aranyakananda y Lawrence (1993) reportaron 15% (Tabla 1). El nivel óptimo de proteína para juvenil *P. monodon* (0,5 a 1,8 g) es de aproximadamente 40%, mientras que para los reproductores es de 50 a 55% (Lee, 1971).

**Tabla 1.** Nivel óptimo de proteínas (porcentaje de alimento) de las especies de camarones.

<b>Especies</b>	<b>Estadio</b>	<b>Requerimiento (%)</b>	<b>Referencias</b>
<i>Litopenaeus</i>	Protozoaea	30	Durruty <i>et al.</i> , 2000
<i>vannamei</i>	Mysis	50	Durruty <i>et al.</i> , 2000
	Postlarvae	20-25	Velasco <i>et al.</i> , 2000
	Postlarvae	30-35	Colvin y Brand, 1977
	Juvenil	32	Kureshy y Davis, 2002
	Juvenil	40	Pedrazzoli <i>et al.</i> , 1998
	Juvenil	30	Cousin <i>et al.</i> , 1991
	Juvenil	>36	Smith <i>et al.</i> , 1985
	Juvenil	15	Aranyakananda y Lawrence, 1993
<i>Litopenaeus</i>	Protozoaea	30	Durruty <i>et al.</i> , 2000
<i>setiferus</i>	Mysis	60	Durruty <i>et al.</i> , 2000
	Postlarvae	50	García <i>et al.</i> , 1998
	Juvenil	28-32	Andrews <i>et al.</i> , 1972
	Juvenil	30	Lee y Lawrence, 1985
	Juvenil	30	Taboada <i>et al.</i> , 1998
<i>Litopenaeus</i>	Postlarvae	60	García y Galindo, 1990
<i>schmitti</i>	Juvenil	28-33	Galindo <i>et al.</i> , 2002
<i>Litopenaeus</i>	Postlarvae	44	Colvin y Brand, 1977
<i>stylirostris</i>	Juvenil	30	Colvin y Brand, 1977
<i>Macrobrachium</i>	Postlarvae	40	Millikin <i>et al.</i> , 1980
<i>rosenbergii</i>	Postlarvae	15	Boonyaratpalin y New, 1982
	Postlarvae	35	Balazs y Ross, 1976
	Juvenil	27	Stanley y Moore, 1983
<i>Marsupenaeus</i>	Postlarvae	45-55	Teshima y Kanazawa, 1984
<i>japonicus</i>	Juvenil	52-57	Deshimaru y Yone, 1978b
	Juvenil	54	Deshimaru y Kuroki, 1974b
	Juvenil	50	Teshima <i>et al.</i> , 2001

continúa Tabla 1

<b>Especies</b>	<b>Estadio</b>	<b>Requerimiento (%)</b>	<b>Referencias</b>
<i>Farfantenaesus brasiliensis</i>	Juvenil	18-28	Hidalgo <i>et al.</i> , 2000
<i>Farfantepenaesus aztecus</i>	Juvenil	40	Venkataramiah <i>et al.</i> , 1975
<i>Farfantepenaesus paulensis</i>	Juvenil	51	Zein-Eldin y Corliss, 1976
<i>Farfantepenaesus notialis</i>	Juvenil	25-35	Ramos y Andreatta, 2011
<i>Farfantepenaesus duorarum</i>	Juvenil	45	Galindo <i>et al.</i> , 2003
<i>Farfantepenaesus californiensis</i>	Postlarvae	50	García <i>et al.</i> , 1998
<i>Penaeus indicus</i>	Postlarvae	44	Colvin y Brand, 1977
	Juvenil	35	Colvin y Brand, 1977
	Juvenil	30-40	Bhaskar y Ali, 1984
	Juvenil	43	Colvin, 1976
<i>Penaeus merguensis</i>	Juvenil	50-55	Aquacop, 1978
	Juvenil	34-42	Sedgwick, 1979
<i>Penaeus monodon</i>	Postlarvae	55	Bages y Sloane, 1981
	Juvenil	40	Aquacop, 1977
	Juvenil	40	Alava y Lim, 1983

Los requerimientos de proteína pueden ser afectados por muchos factores, incluyendo la especie, hábitos de alimentación, las fases del ciclo de vida, reproducción, aspectos dietéticos tales como proteínas de calidad y de la proteína / relación de energía y los factores abióticos

como la salinidad y la temperatura (García-Galano, 2006).

a) *Aminoácidos*

Las proteínas se componen de aminoácidos unidos con enlaces peptídicos y enlaces transversales entre cadenas con enlaces sulfidrales y de hidrógeno. Aunque existen unos 200 aminoácidos (AA) en fuentes naturales, sólo 20 constituyen la mayoría de las proteínas, con diferentes propiedades físicas y químicas. El éxito de la síntesis de una proteína particular será dado por la disponibilidad de los aminoácidos requeridos.

Animales no requieren proteínas de la dieta *per se*, sino más bien algunos aminoácidos individuales que forman parte de ellos. Diez aminoácidos se consideran esenciales (AAE) y esta esencialidad se determina únicamente por la necesidad de suministrar a los animales a través del alimento como el cuerpo no puede sintetizarlos a un ritmo adecuado para satisfacer sus necesidades metabólicas. Por lo tanto la esencialidad o no esencialidad de un aminoácido se refiere a los requerimientos dietéticos, teniendo dos funciones importantes en el metabolismo.

La determinación de los requerimientos cuantitativos de AAE se ha establecido generalmente en experimentos en los que las curvas de dosis-respuesta de crecimiento

utilizan como un criterio de respuesta (Tabla 2). Otra alternativa a la estimación de los AAE es el método de supresión que es un procedimiento rápido y exacto que ha sido usado en peces (NRC, 2011). Este método depende de la asunción de que la reducción dietética de un AA no esencial no tiene efecto en la retención de nitrógeno corporal caso contrario se producirá un descenso si un AA es individualmente limitante en la dieta. Otro enfoque metodológico se ha basado en la determinación de las concentraciones de AA libres en el plasma y los tejidos contra un gradiente de concentración de aminoácidos en la dieta. La oxidación de los AA libres en el tejido usando marcadores radiactivos es otro método utilizado aunque su uso se ha cuestionado en peces (Kim *et al.*, 1992a) y camarones (Amouroux *et al.*, 1997). Se supone que aumenta cuando un AAE se encuentra en exceso. Un método simple que permite una aproximación a los requerimientos de AAE, es el análisis basado en el perfil de AAE del músculo o animal entero. Millamena *et al.* (1997) reportaron que el requerimiento de treonina en *P. monodon* era consistente con los niveles de este aminoácido que se encuentra en el músculo. Una forma de conocer los requerimientos de los aminoácidos en reproductores sería determinando el perfil de estos en su lipovitelina (Harrison, 1990).

Aunque el perfil de AAE de músculo es indicativo de los requerimientos de AAE de las especies, otros factores pueden reducir o aumentar el efecto de una dieta con un cierto equilibrio de AA: 1) Hay una pérdida de AA para la producción de energía, independientemente del perfil de AA del alimento, 2) la energía de la dieta puede variar el requerimiento de AAE (Cowey, 1994).

**Tabla 2.** Niveles óptimos (porcentaje de proteína en la dieta) para EAA en algunas especies.

Especies	Camarón tigre ( <i>Penaeus monodon</i> )	Camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Camarón Kuruma ( <i>Marsupeaneus japonicus</i> )
Arginina	5,3-5,5 (a,b)	5,6 (h)	3,2-5,3 (n,o)
Histidina	2,2 (c)		1,2 (n)
Isoleucina	2,7 (c)	3,9 (i)	2,6 (n)
Leucina	4,3 (c)	5,8 (j)	3,8 (n)
Lisina	5,2 (a,d)	3,9-4,7 (k,l)	3,8 (n)
Metionina	2,4-2,9 (d,e)		1,4 (n)
Fenilalanina	3,7 (c)		3,0 (n)
Treonina	3,5 (f)	3,5-3,8 (m)	2,6 (n)
Triptofano	0,5 (c)		0,8 (n)
Valina	3,4 (g)		2,8 (n)

a) Millamena *et al.* (1998); b) Chen *et al.* (1992); c) Millamena *et al.* (1999); d) Richard *et al.* (2010); e) Millamena *et al.* (1996a); f) Millamena *et al.* (1997); g) Millamena *et al.* (1996b); h) Zhou *et al.* (2012); i) Liu *et al.* (2014a); j) Liu *et al.* (2014b); k) Xie *et al.* (2012); l) Fox *et al.* 1995; m) Zhou *et al.* (2013); n) Teshima *et al.* (2002); o) Alam *et al.* (2004).

La metionina y lisina son los principales AA limitante en alimentos acuícolas de bajo contenido de HP (Gatlin *et al.*, 2007) que se supera con la suplementación de DL-metionina o análogos hidroximetil y L-lisina. La L-lisina

producida por la fermentación y establecida bajo la forma de clorhidrato de Lisina (Tosaka *et al.*, 1983), es el más popular AA cristalino utilizado como un suplemento nutricional en alimentos para animales. Una metionina hidroxí análoga también conocida como DL-2-hidroxi-4-metiltiobutanoico ácido (HMTBA) ha llegado a ser suplementado a alimentos acuícolas como fuente de metionina aunque su biodisponibilidad relativa ha sido cuestionada por el NRC (2011). Sin embargo, Nunes y colaboradores (2014) argumentan que una eficacia del 75% al 80% reportado por NRC no se basó en todos los estudios publicados referente a acuicultura y las aves de corral donde evaluaron la biodisponibilidad relativa de DL-HMTBA a DL-Met. Estos autores consideran que la biodisponibilidad relativa debe estar entre 81% y 100% sobre la base de estimaciones de biodisponibilidad DL-HMTBA realizadas por Vedenov y Pesti (2010) y Vázquez-Añón *et al.* (2006).

Son pocos los estudios en animales acuáticos que han demostrado antagonismo entre lisina y arginina (Kaushik y Fauconneau, 1984; Kim *et al.*, 1992b). Recientemente, Feng *et al.* (2013) para el camarón *L. vannamei* encontró que la tasa de crecimiento, FCR, proteína del cuerpo, el contenido de lisina y arginina del cuerpo fueron significativamente afectados por la lisina y arginina dietética mejorando cuando la relación de estos dos AA



fue entre 1: 0,88 y 1: 1,05. Sin embargo, ningún antagonismo se ha encontrado en otros animales acuáticos tales como alevines de bagre de canal (Robinson *et al.*, 1981), *Dicentrarchus labrax* (Tibaldi *et al.*, 1994) y *M. japonicus* (Hew y Cuzon, 1982). Se requieren más estudios sobre la relación entre lisina y arginina que ayudan a dilucidar estos informes contrastantes. Al contrario de *M. japonicus* y *P. monodon*, donde se ha establecido el requerimiento de AAE, *L. vannamei* cuenta con cinco (tres en agua de baja salinidad) AAE a pesar de su importancia económica.

El modo de expresión de los requerimientos de aminoácidos de peces es un tema de desacuerdo entre los nutricionistas de peces. Kim *et al.* (1991) consideran que los requerimientos de AAE son mejor expresados como un porcentaje de la dieta mientras Cowey y Cho (1993) informaron que los requerimientos de AAE en relación con el contenido de proteína de la dieta (% de proteína o g / 16 g N) y Rodehutschord *et al.* (1997) indican que los requerimientos de AAE deben expresarse en relación con el contenido de energía de la dieta (por ejemplo, energía digestible DE). Hua (2013) dilucidó esta controversia después de llevar a cabo un análisis no lineal modelo mixto y análisis multinivel sobre un conjunto de datos de requerimiento de lisina. Los resultados mostraron que la expresión del requerimiento como un

porcentaje de proteína de la dieta proporciona una mejor bondad de ajuste que a la concentración fija de la dieta o como al contenido de una tasa de DE. Aunque, para establecer la cantidad de aminoácidos requeridos por kg de pez por día es de mayor interés no sólo para enfoque científico sino también para el cálculo del tamaño de la ración.

### **1.1.2.- Lípidos**

Los lípidos son compuestos orgánicos que son insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos (solventes no polares). Los lípidos son la fuente de energía más concentrada de nutrientes, teniendo 2,25 veces más energía por unidad de peso de las proteínas y carbohidratos. Sin embargo, un limitado rango de energía puede ser usado en camarones porque niveles de lípidos en la dieta mayores a 12% producen disminución en el crecimiento (Kanazawa *et al.*, 1977). Otras funciones son componente estructural de las membranas y de algunas hormonas y vitaminas liposolubles como A, D, E, K. Hay básicamente dos clases de lípidos - lípidos neutros y polares. Los lípidos neutros (NL) incluyen ácidos grasos, alcoholes, triglicéridos, ceras y esteroides que sirven principalmente como almacenamiento y transporte de

combustibles metabólicos mientras que los lípidos polares incluyen glicerofosfolípidos y gliceroglicolípidos.

a) *Ácidos grasos esenciales*

Las especies acuáticas tienen mayores requerimientos por los  $\omega$ 3 en lugar de los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 6. Requerimientos para especies de agua dulce y marinas son diferentes (Sargent *et al.*, 2002). Las mayores necesidades de ácidos grasos (AG)  $\omega$ -3 en los peces son necesarios para que funcione correctamente las membranas, y mantener la fluidez adecuada. Especies acuáticas requieren AG  $\omega$ -3 para mantener la fluidez de membrana a temperaturas ambientales más bajas en comparación con las especies terrestres. Los camarones tienen una capacidad limitada para convertir precursores AG  $\omega$ -3 en ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA). Forster *et al.* (2011) investigando el efecto del ácido estearidónico (SDA, 18:4 $\omega$ -3) encontró una disminución en el crecimiento de los camarones *L. vannamei* y una significativa reducción en los niveles de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en el tejido cuando la harina de soya reemplazó la HP en los alimentos conteniendo aceite de soya. Este estudio sugiere que los camarones no pueden convertir de manera eficiente SDA (o ácido linolénico) en EPA y

DHA, cuando la HP o aceite de pescado está ausente del alimento.

Se han realizado varios estudios sobre los niveles necesarios de los ácidos grasos esenciales (AGE) en la dieta (Tabla 3). Xu *et al.* (1993) estudiaron el efecto de los AG de la dieta sobre el crecimiento y la eficiencia de conversión del alimento del juvenil *P. chinensis* encontró que el DHA en el 1% produjo significativamente un mejor crecimiento, frecuencia de muda y supervivencia que 1% ácido linolénico (ALA), 1% ácido linoleico (LA), y 1% ácido araquidónico (ARA). Kanazawa *et al.* (1985) observaron un aumento en la supervivencia de *M. japonicus* cuando la dosis de HUFA fue del 1%; sin embargo supervivencia disminuyó cuando aumentó a 2%. González-Félix *et al.* (2002a) no encontró ningún aumento en el requerimiento de HUFA en *L. vannamei* con el aumento de lípidos de la dieta. Los resultados mostraron que esta especie reúne el requerimiento de HUFA con 0,5%, mientras que un nivel de 2% HUFA en la dieta causa una disminución en el crecimiento. Kanazawa *et al.* (1979a) trabajando con *M. japonicus* determinó que la suplementación de una dieta que contiene triglicéridos de cadena media con 1% LA o ALA aumenta el peso corporal, pero la mejor supervivencia y crecimiento fueron obtenidos con la adición de DHA.

**Tabla 3.** Niveles óptimos de ácidos grasos esenciales publicados para camarón.

Especies	18:3 $\omega$ -3	18:2 $\omega$ -6	C20:5 $\omega$ -3	C22:6 $\omega$ -3	C20:4 $\omega$ -6	Tasa $\omega$ -3 to $\omega$ -6	Referencia
Camarón azul ( <i>Penaeus stylirostris</i> )	-	-	-	-	-	1,8:1	Fenucci <i>et al.</i> , 1981
Camarón café ( <i>Farfantepenaeus aztecus</i> )	1-2%	-	-	-	-	-	Shewbart y Mies, 1973
Fleshy prawn ( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> )	0,7-1,0%	-	-	-	-	-	Xu <i>et al.</i> , 1993
	-	-	-	1,0%	-	-	Xu <i>et al.</i> , 1994
Camarón gigante de río ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	-	-	-	0,075%	-	-	D'Abramo y Sheen, 1993
	-	-	-	-	0,08%	-	D'Abramo y Sheen, 1993
Camarón Kuruma ( <i>M. japonicus</i> )	-	-	-	-	-	-	Kanazawa <i>et al.</i> , 1977 Kanazawa <i>et al.</i> , 1978; 1979a
	-	-	1,1%	o	1,1%	-	-
Camarón tigre ( <i>P. monodon</i> )	1,0%	or	1,5%	-	-	-	Glencross y Smith, 1999
	1,5%	and	1,0%	-	-	-	Glencross y Smith, 1999
	-	-	-	0,9%	o	0,9%	-
	-	-	-	-	-	NR	Glencross y Smith, 2001a Glencross y Smith, 2001b
	-	-	-	-	-	2,5:1	Glencross <i>et al.</i> , 2002
	2,5	-	-	-	o	1,44	-
Camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	-	-	-	0,5%	o	0,5%	-
	-	-	-	-	-	0,5%	-
	-	-	-	-	-	-	Merican y Shim, 1997 Gonzales-Felix <i>et al.</i> , 2003 Gonzales-Felix <i>et al.</i> , 2003

Una dieta suplementada con HUFA mostró un mayor aumento de peso en los camarones *L. vannamei* en comparación con el efecto producido por otras dietas con diferentes proporciones de LA y ALA (Gonzalez-Felix *et al.* 2003).

#### b) *Fosfolípidos*

Los fosfolípidos (PL) son ingrediente esencial en las dietas de peces larvales y han mostrado mejorar el crecimiento y supervivencia larval, la utilización del alimento, reducir FCA, la tasa de eficiencia proteica (TEP), e inhibir el valor peróxido en la dieta (Coutteau *et al.*, 1997; Tocher *et al.*, 2008 y Tocher, 2003).

PL también ha sido encontrado a mitigar el estrés en larvas de peces causadas por el aumento en la temperatura del agua y la reducción del oxígeno disuelto y la salinidad. Zwingelstein *et al.* (1998) reportaron que los peces eurihalino y los crustáceos se adaptan a los cambios en salinidad y / o temperatura a través del mecanismo de la descarboxilación de la fosfatidilserina y subsecuente metilación de la fosfatidiletanolamina (Gisbert *et al.*, 2005). PL resultaron ser importante fuente de energía, AGE (Tocher, 1995), suministro de EPA y DHA en la dieta, fósforo (Lall, 2002; Uyan *et al.*, 2007), colina e inositol (Geurden *et al.*, 1995a,b). Los PL permite a los lípidos hidrofóbicos ser transportados en medios acuosos a través de la formación de las interfases lípido / agua (sales biliares, ácido cólico y derivados). PL tiene un papel estructural importante en la emulsión de los lípidos de la dieta junto con las sales biliares que tienen dominio hidrófilo e hidrófobo (Olsen y Ringo, 1997; Kasper y Brown, 2003). PL tiene un importante papel en el transporte de lípidos (Fontagné *et al.*, 1998) y se ha informado de la acumulación de vacuolas lipídicas en los enterocitos intestinales de Arctic Char privado lecitina de soya en el alimento (Olsen *et al.*, 1999).

Los PL son precursores importantes para una serie de mediadores biológicamente activos del metabolismo de eicosanoides incluyendo, diacilglicerol, fosfatos de inositol y los factores de activación de plaquetas (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2003). PL puede servir como una fuente de energía para los peces en ciertas circunstancias tales como la embriogénesis y el desarrollo larvario temprano. Durante la embriogénesis y el desarrollo larval temprano, la cantidad absoluta de PL disminuye especialmente en huevos de

peces marinos ricos en PL. Un catabolismo completo de PL para la energía sería la pérdida de importante ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

**Tabla 4.** Niveles óptimos de fosfolípidos en diferentes especies de camarón.

Especies	Estadío	Requerimiento óptimo (%)	Referencias
<i>P. monodon</i>	Juvenil	1,0-1,5 Lecitina de soya	Paibulkichakui <i>et al.</i> , 1998
<i>L. vannamei</i>	Juvenil	1,5 PC (de soya)	Coutteau <i>et al.</i> , 1996
	Juvenil	6,5 Lecitina de soya sin aceite	Coutteau <i>et al.</i> , 1996
	Larva	4,6 Lecitina de soya (60%PC)	Niu <i>et al.</i> , 2012a
<i>M. japonicus</i>	Juvenil	1,0 (PC+PE)	Kanazawa <i>et al.</i> , 1979b
	Juvenil	3,0 Lecitina de soya PE & PI	Teshima <i>et al.</i> , 1986a,b
	Larva	3,0 Lecitina de soya	Kanazawa, 1983
	Larva	0,5 to 1,0 (PC & PI)	Kanazawa <i>et al.</i> , 1985
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Juvenil	2 Lecitina de soya	Kanazawa, 1993
<i>P. penicillatus</i>	Juvenil	1,25 PC de Lecitina de soya	Chen y Jenn, 1991
<i>P. menguiensis</i>	Juvenil	1-2 Lecitina de soya (40%PC+15%PE)	Thongrod y Boonyaratpalin, 1998

Nota: PC: Fosfatidilcolina; PE: Fosfatidiletanolamina; PI: Fosfatidilinositol

Algunos crustáceos son capaces de biosintetizar PL desde AG y diglicéridos, como ha sido demostrado por Shieh (1969) en la langosta *Homarus americanus*. Sin embargo, la tasa de biosíntesis, especialmente durante el crecimiento larval, parece ser menor que la demanda metabólica (D'Abramo *et al.* 1981; Kanazawa *et al.*, 1985; Teshima *et al.*, 1986a). Ha habido varias revisiones (Coutteau *et al.*, 1997, Teshima 1997, Gong *et al.*, 2004a) que reportan resultados de la acción de los PL sobre diversas especies de camarones. Los requerimientos de los fosfolípidos en las dietas para diferentes especies de camarones peneidos son variados (Tabla 4). Gong *et al.* (2001) no encontraron diferencias en el crecimiento y supervivencia de juveniles *L. vannamei* al probar con tres tipos de lecitina de soya a los mismos niveles de inclusión en el alimento: tipo I (97,6% PL); tipo II (71,4%) y tipo III (48,4%); ellos recomendaron niveles de 3 a 5% PL en la dieta. González-Felix *et al.* (2002b) encontraron que juveniles *L. vannamei* tuvieron mayores pesos finales y conversión alimenticia con dietas que contenían 5% diferentes aceites suplementado con 3,1% de lecitina en comparación con no suplementar con este compuesto.

En postlarvas de *M. japonicus*, Tackaert *et al.* (1991) observaron que las dietas semipurificadas sin añadir PL pero con el colesterol, promueven un mejor crecimiento y una mayor resistencia al estrés osmótico que la obtenida con dietas suplementadas solamente con fosfatidilcolina. Gong *et al.* (2004b) atribuyen el efecto beneficioso de los PL en el estrés osmótico debido a que los PL facilitan el metabolismo lipídico de camarones y mejoran la utilización de las reservas de energía. Según este estudio, los PL son superiores a los lípidos neutros para satisfacer las necesidades de energía. Evidencia sobre la importancia de los PL dietarios en la nutrición de crustáceos marinos fue reunida en varios estudios. D'Abramo *et al.* (1982) informaron que la ausencia de fosfatidilcolina en dietas purificadas de langostas causó una disminución significativa en los niveles de colesterol en suero lo cual fue atribuido a una disminución de las lipoproteínas. En contraste, Hilton *et al.* (1984) y Kanazawa (1993) no encontraron ningún efecto beneficioso de suplementar lecitina a las dietas alimentadas a camarones postlarvas y juveniles de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*.

c) *Esteroles*

Crustáceos y algunos moluscos requieren fuentes dietarias de esterol para el crecimiento y la supervivencia a causa de la ausencia de capacidad de *novo* síntesis de esteroides (Kanazawa, 2001). El colesterol es el principal esterol en los crustáceos, ya que no poseen la capacidad de sintetizar de *novo* el anillo de esteroides a partir de acetato, por tanto, es un componente esencial que debe proporcionarse en la dieta (Teshima y Kanazawa, 1971a; Teshima *et al.*, 1976; Teshima, 1982). Además de su función en las membranas también es el precursor de varias moléculas bioactivas tales como hormonas esteroides en especial la hormona de la muda, ácidos biliares y vitamina D3. (Teshima y Kanazawa, 1971a; Teshima, 1982). Para facilitar la solubilización y absorción de colesterol un conjunto de detergentes biológicos son sintetizados por el hepatopáncreas entre ellos N- (Ndodecanoyl-sarcosil) de taurina (Lester *et al.* 1975) y secretada en el lumen del intestino. Teshima *et al.* (1974) encontraron que *M. japonicus* digiere 82,6% de colesterol y 77,3-98,3% de fitosteroides como ergosterol, colesterol 24-metileno, brasicasterol,  $\beta$ -sitosterol. Los autores



también sugieren la existencia de una relación entre la digestión del colesterol y la composición del alimento.

Del mismo modo, la capacidad de bioconvertir esteroides de *novo* es generalmente baja o ausente, y varía entre especies crustáceas. Crustáceos poseen la capacidad de desalquilar algunos esteroides C28 y C29 a colesterol (Kanazawa *et al.*, 1971b; Teshima *et al.*, 1983). Varios estudios han indicado que los esteroides dietéticos tales como  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y ergosterol son inferiores a los de colesterol en promover el rendimiento en *M. japonicus* (Kanazawa *et al.*, 1971a), *Macrobrachium rosenbergii* (D'Abramo y Daniels, 1994), *Homarus* sp., (D'Abramo *et al.*, 1984) y *L. vannamei* (Castille *et al.*, 2004). Esto implica que un suministro dietético de esteroles es necesaria para el crecimiento. Sin embargo, la conversión de los esteroides a colesterol ha sido demostrada para brasicasterol en *Artemia salina* Leach (Teshima y Kanazawa, 1973a),  $\beta$ -sitosterol en *Portunus trituberculatus* (Teshima y Kanazawa, 1972), demosterol en *Palaemon serrato* (Teshima *et al.*, 1975) y *M. japónicas* (Teshima y Kanazawa, 1973b) y ergosterol en *A. salina* (Teshima y Kanazawa, 1971b) y *P. trituberculatus* (Teshima, 1971). Morris *et al.* (2011) alimentando camarones *L. vannamei* con una dieta suplementada al 0,1% de fitosteroides extraído de la soya (que contiene brasicasterol 2,5%, campesterol 26,5%, 18,2% estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 46,9%,  $\beta$ -sitostanol 2,2%, 0,6% campestanol y otros esteroides 3,1%), encontraron una respuesta de crecimiento similares a los camarones alimentados con colesterol.

**Tabla 5.** Niveles óptimos de colesterol de varias especies de crustáceos.

Especies	Requerimiento óptimos (% en dieta)	Referencia
<i>M. japonicus</i>	0,5-1,0	Kanazawa <i>et al.</i> , 1971a
	0,2	Shudo <i>et al.</i> , 1971
	2,1	Deshimaru y Kuroki, 1974a
	1*	Teshima <i>et al.</i> , 1983
	1*	Teshima <i>et al.</i> , 1982
<i>P. monodon</i>	0,54	Kai y Kanazawa, 1989
	0,5	Chen, 1993
<i>P. penicillatus</i>	0,5	Chen y Jenn, 1991
<i>P. menguiensis</i>	NR en juvenil	Thongrod y Boonyaratpalin, 1998
<i>Artemesia longinaris</i>	0,5	Petriella <i>et al.</i> , 1984
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	0,12	Briggs <i>et al.</i> , 1988
	0,11-0,26	Teshima <i>et al.</i> , 1997
	0,6	D'Abramo, 1998
<i>Homarus americanus</i>	0,5	Castell <i>et al.</i> , 1975
	NR en adulto	Castell y Covey, 1976
	0,12	D'Abramo <i>et al.</i> , 1984
	0,25	Kean <i>et al.</i> , 1985
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	0,4	D'Abramo <i>et al.</i> , 1985
<i>Carcinus maenas</i>	1,4-2,1	Ponat y Adelung, 1983
<i>Scylla serrata</i>	0,61*	Suprayudi <i>et al.</i> , 2012
<i>L. vannamei</i>	0,23-0,42	Duerr y Walsh, 1996
	0,35 (0% lecitina de soya desengrasada)	Gong <i>et al.</i> , 2000
	0,14 (1,5% lecitina de soya desengrasada)	Gong <i>et al.</i> , 2000
	0,13 (3,0% lecitina de soya desengrasada)	Gong <i>et al.</i> , 2000

El óptimo o los niveles requeridos de colesterol dietética para las diferentes especies de crustáceos reportados hasta la fecha se resumen a ser de aproximadamente 0,1-2,0% de la dieta (Tabla 5), y puede ser dependiente de la edad y la dieta. Ejemplos de las necesidades estimadas de colesterol varían de 0,05 a 0,5% para *L. vannamei* (Duerr y Walsh, 1996; Gong *et al.*, 2000). Morris *et al.* (2011) en presencia de la productividad natural, indicaron que el requerimiento de colesterol para el crecimiento del *L. vannamei* parece estar alrededor de 0,11%, lo cual resultó en un rendimiento de camarón similares como aquellos con niveles más altos, sin embargo, un análisis de regresión predijo que el requerimiento del colesterol para el máximo crecimiento sea 0,15% de la dieta. Variaciones reportadas entre los estudios anteriores pueden ser debido a una variedad de factores que incluyen la falta de PL dietéticos

(Gong *et al.*, 2000) y pueden variar con las tasas de alimentación. Teshima (1998), utilizando un método factorial estimó los niveles óptimos de colesterol en la dieta para *M. japonicus* son 0,50, 0,40 y 0,29% en las tasas de alimentación diaria de 3, 5 y 7% del peso corporal. El exceso de colesterol dietario ha sido reportado a tener efectos adversos sobre el crecimiento de las post-larvas de camarones (Niu *et al.*, 2012a).

### 1.1.3.- Carbohidratos

Los hidratos de carbono son sólo una pequeña fracción de la masa corporal de los animales, pero comprenden la mayor parte de la masa de las plantas. En los camarones y peces sirven como fuente de energía para ejecutar las funciones metabólicas con poco almacenamiento.

#### a) *Utilización de hidratos de carbono*

Hidratos de carbono es el componente de la dieta a la que se ha atribuido más interferencia. Sin embargo su utilización se justifica porque son la fuente más barata de energía dietaria en la naturaleza y su inclusión en los alimentos conducen a mejorar el crecimiento y la tasa de conversión del alimento, porque más proteína se utilizará para el crecimiento y no como una fuente de energía (Stone, 2003), así también por sus propiedades aglutinantes (almidón gelatinizado, alginatos, gomas) reducen los finos en los alimentos peletizados y extruidos y, además de que son metabolitos intermedios de componentes biológicos como quitina, ácidos nucleicos, mucopolisacáridos.

La utilización de carbohidratos depende de la especie y etapa de desarrollo, la complejidad de la molécula y la cantidad de los mismos en la alimentación, la interacción con otros componentes de la dieta, el proceso tecnológico y la temperatura del agua y la salinidad (Medale *et al.*, 1999; Hemre *et al.*, 2002; Stone, 2003; Gaxiola *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2011). Peces y camarones, en general, poseen enzimas para la hidrólisis tanto hidrato de carbonos simples y complejos. Varios carbohidrasas se han identificado en los crustáceos  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa, maltasa, sucrasa, quitinasa y celulasa (Guillaume y Ceccaldi, 2001). Aunque se cree que las dos últimas enzimas se producen por bacterias celulolíticas y las quitinolíticas. Soler (1996) informaron de que 60% de las bacterias presentes en el intestino de *L. setiferus* muestran un rápido

crecimiento, tolerancia a pH bajo, algunos actividad de la enzima 85 a 100% de actividad quitinolítica.

Tres isoformas de amilasa se han determinado en *L. vannamei* (Van Wormhoudt *et al.*, 1996) y no ha sido caracterizado ninguno zimógeno para esta enzima en crustáceos (Carrillo y González, 1998). Dependiendo del grado de actividad amilolítica en camarones peneidos puede incluir diferentes proporciones de compuestos de hidratos de carbono por lo general almidones en las dietas. Teniendo en cuenta que el almidón es el componente más barato en dietas para los organismos acuáticos, es de importancia para la producción de camarón ya que sustituye parcialmente la proteína (Cousin *et al.*, 1996) como fuente de energía. Vega-Villasante *et al.* (1993) determinaron que la actividad de la amilasa en el tracto digestivo de *Farfantepenaeus californiensis* es halotolerante y parece ser mejor activado en presencia de bajas concentraciones de iones tales como magnesio, calcio y sodio. Hay que tener presente que los crustáceos de agua dulce tienen más capacidad para digerir especialmente los carbohidratos complejos, comparando a los crustáceos marinos (Lee y Lawrence, 1997).

Con respecto a la utilización de fuentes de almidón crudo en dietas para *L. vannamei*, es reportado que el trigo es más digerible que el maíz y el sorgo (Cousin *et al.*, 1996). Davis y Arnold (1993) evaluaron en *L. vannamei* la digestibilidad aparente de cinco fuentes de carbohidratos y maíz cocidos. Los resultados muestran que valores de digestibilidad aparente de la energía (ADE) para almidón de trigo, trigo integral, Nutribinder y sorgo fueron significativamente más alto que la ADE de maíz cocidos. Catacutan (1991) quienes alimentando camarón *P. monodon* con dietas isoproteicas observaron que al aumentar el nivel de carbohidratos la digestibilidad de la materia seca y los lípidos fueron afectadas en forma positiva y negativa, respectivamente. En camarones *P. orientalis* Shen y Liu (1992) observaron que el nivel de almidón en la dieta se correlaciona negativamente con su digestibilidad. Un comportamiento similar fue reportado por Velurtas *et al.* (2011) quienes evaluaron el efecto de diferentes proporciones de almidón / celulosa (30/0, 20/10, 10/20, 0/30) sobre la aparente digestibilidad en dos especies de peneidos: *Artemesia longinaris* y *Pleoticus muelleri*. Los coeficientes de

digestibilidad aparente de proteína (DAP) se redujeron de 83,7% a 51,2% para *A. longinaris* y de 71,9% a 7,6% para *P. muelleri* como los niveles de almidón en la dieta aumentaron lo que sugiere que el primero tiene un comportamiento herbívoro y el último tiene hábitos omnívoros.

Según Niu *et al.* (2012b) almidón de trigo y sacarosa son mejor utilizados como fuentes de hidratos de carbono para juveniles de *P. monodon* debido a la mayor actividad de amilasa del hepatopáncreas, la digestibilidad de nutrientes, aumento de peso y el aumento de biomasa obtenida con camarones alimentados con estas fuentes de carbohidratos en comparación con los de otras fuentes (almidón de patata, almidón de maíz, dextrina, maltosa y glucosa). Además, también se informó que las actividades de la fosfogluconato deshidrogenasa y la hexoquinasa aumentaron como carbohidratos de la dieta se hicieron más adecuados para soportar el mejor rendimiento de crecimiento.

#### b) *Digestibilidad de carbohidratos*

Fuente (contenido en amilosa / amilopectina, tamaño de los gránulos), el nivel dietético y el estado físico (grado de gelatinización y la complejidad molecular) afectan la digestibilidad de los carbohidratos. Las diferencias de digestibilidad entre las fuentes de almidón se han atribuido al contenido de amilosa / amilopectina. En la trucha arco iris, Gaylord *et al.* (2009) reportaron que la digestibilidad de amilosa es reducida en comparación con la amilopectina. Digestibilidades de carbohidratos también se ven afectadas por el tamaño de los gránulos, que se administra por origen botánico. Molina-Poveda y Gómez (2002) informaron que el almidón de yuca resultó en una aparente digestibilidad de carbohidratos (ADC) significativamente mayor debido a que sus gránulos tienen un tamaño de partícula de 4-24 micras que es menor a 30 a 70 micras de los gránulos de almidón de banano y plátano. Este tamaño de partícula más pequeño aumenta la superficie de contacto de enzimas carbohidrasas haciéndolos más adecuados como fuente de carbohidratos.

Un efecto negativo de nivel de inclusión de carbohidratos en la digestibilidad del almidón se ha reportado en varias especies (Arnese *et al.*, 1995; Stone *et al.*, 2003). Varios trabajos muestran que la digestibilidad de las dietas con fuentes de carbohidratos gelatinizados es más alta que las dietas que contienen la misma fuente de carbohidratos no gelatinizado (Tabla 6). En

camarones también se ha reportado el mismo efecto, Cousin *et al.* (1996) quienes alimentando *L. vannamei* (18-25g) con diferentes fuentes de carbohidratos a un nivel de inclusión de 35% en la dieta, observaron un ADC mayor en las dietas que contienen almidones gelatinizados. En general, los peces y camarones digieren mejor fuentes carbohidratos purificados o procesados que crudos.

**Tabla 6.** Coeficiente de digestibilidad de varias fuentes de carbohidratos reportados en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Fuente de carbohidratos	Método de procesamiento	Nivel de Inclusión (%)	ADC (%)	Referencia
Almidón de maíz	Crudo	35	85	Cousin <i>et al.</i> , 1996
Almidón de maíz	Alta amilosa	35	63	
Almidón de maíz	Ceroso	35	85	
Almidón de maíz	Gelatinizado	35	94	
Almidón de maíz	Gelatinizado	35	96	
Almidón de papa	Crudo	35	72	
Almidón de papa	Gelatinizado	35	93	
Almidón trigo	Crudo	35	92	
Harina de trigo		36	78	Rivas-Vega <i>et al.</i> , 2006
Frijol	Crudo	15	77	
Frijol	Cocinado	15	83	
Frijol	Extruido	15	82	
Mandioca o Tapioca	Nativo	35	75	Molina-Poveda y Gómez, 2002
	Gelatinizado	35	88	
Plátano	Nativo	35	69	
	Gelatinizado	35	81	
Banano	Nativo	35	45	
	Gelatinizado	35	74	

#### 1.1.4.- Bioenergética

Bioenergética o energética nutricional estudia el flujo de energía a través de sistemas de vida y su regulación a través del equilibrio entre el consumo de energía en la forma de alimentos y la utilización de la energía por los animales para los procesos que sustentan la vida. Todos los procesos en el cuerpo del animal implican el intercambio y la transformación de la energía, siendo la energía definida como la capacidad de hacer el trabajo o utilizados para la

síntesis química y los procesos anabólicos en el crecimiento. Peces y crustáceos utilizan preferentemente las proteínas como fuente de energía, principalmente debido a la mala utilización de fuentes de carbohidratos de baja digestibilidad y, además, debido a que en algunas especies altos niveles de lípidos pueden causar anomalías en los animales, reducir el crecimiento y aumentar la mortalidad.

Peces y camarones requieren energía para el crecimiento, la reproducción y la actividad muscular lo cual es tomado de la oxidación de los alimentos. La cantidad de energía que necesita un organismo depende de la etapa del ciclo de vida, la temporada del año y las condiciones ambientales. Un organismo necesitará más energía por unidad de peso en sus primeras etapas que los adultos; del mismo modo, la temperatura del medio ambiente tiene un efecto decisivo en la tasa metabólica de los organismos.

a) *Relación Proteína:Energía.*

El conocimiento de los niveles óptimos de proteínas y economización de esta, utilizando fuentes de energía digestible no proteicas como carbohidratos y lípidos son necesarias para reducir los costos de alimento y producir un máximo crecimiento (Bautista, 1986). Además de los beneficios económicos, permite un sistema de producción medio ambientalmente más amigable, evitando el exceso de proteínas en la dieta, por lo tanto disminuyendo la cantidad de amonio excretado (Shiau y Chou, 1991).

Una forma de reducir el contenido de proteína en las dietas es a través de un adecuado equilibrio entre proteínas y lípidos.

Los peces y camarones tienen la capacidad de utilizar mejor los hidratos de carbono tipo polisacáridos que los di- y monosacáridos (Shiau y Peng, 1992; 1993). En camarones *P. monodon*, Shiau y Peng (1992) encontraron que cuando el nivel de proteína se redujo de 40% a 30% y los niveles de almidón aumentaron de 20 a 30% esto no redujo el aumento de peso, supervivencia y la eficiencia alimenticia. Estos resultados sugieren que el almidón se utiliza eficientemente como una fuente de energía en lugar de la proteína.

Algunas investigaciones para determinar un apropiado balance proteína / energía han sido hecho en varias especies de camarones con diversos resultados como es presentado en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Relación óptima de proteína/energía dietaría en varias especies de camarones

<b>Especies</b>	<b>Tasa Proteína / Energía (mg/kJ)</b>	<b>Peso corporal (g)</b>	<b>Referencias</b>
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	21,5-50,4	0,95	Colvin, 1976
<i>Litopenaeus merguensis</i>	26,8	0,3	Sedgwick, 1979
	28,7	0,6	Bautista, 1986
	26,8	0,5	Hajra <i>et al.</i> ,1988
<i>Penaeus monodon</i>	26,1	0,8	Shiau y Chou,1991
<i>Litopenaeus schimitti</i>	28,4-35,1	0,25	Fraga <i>et al.</i> ,1992
<i>Litopenaeus vannamei</i>	19,1-28,7	1	Cousin <i>et al.</i> ,1993

La determinación de las necesidades energéticas del camarón ha sido una tarea difícil, ya que las necesidades de energía calculados en algunos estudios son válidos para aquellos criados en condiciones específicas (composición del alimento, la tasa de alimentación, temperatura, estadios de la vida, genéticos, período de crianza). Además, otro problema importante asociado con la determinación de necesidades de energía dietética es que los peces tienen diferentes deposiciones de nutrientes directamente relacionados con las tasas de crecimiento y, por tanto, diferentes requerimientos de nutrientes y energía. Hay varios modelos sobre la bioenergética desarrollado para predecir el crecimiento, la ración de pienso, FCR y salida de residuos de varias especies de peces (Bureau *et al.*, 2002, 2003; Glencross *et al.*, 2011; Rosas *et al.*, 1998) Sin embargo, estos modelos factoriales pueden no funcionar bien bajo amplias prácticas de manejo condiciones sanitarias y las variables ambientales encontradas en la producción de peces (Dumas *et al.*, 2008).



## **1.2.- Fuentes alternativas a la harina de pescado**

Una preocupación primordial de la crianza de peces es el alto coste de los alimentos, y la fuerte dependencia a la harina de pescado (HP) y el aceite de pescado (AP) como las fuentes de proteínas y de energía primaria en estos alimentos (Tacon y Metian, 2008).

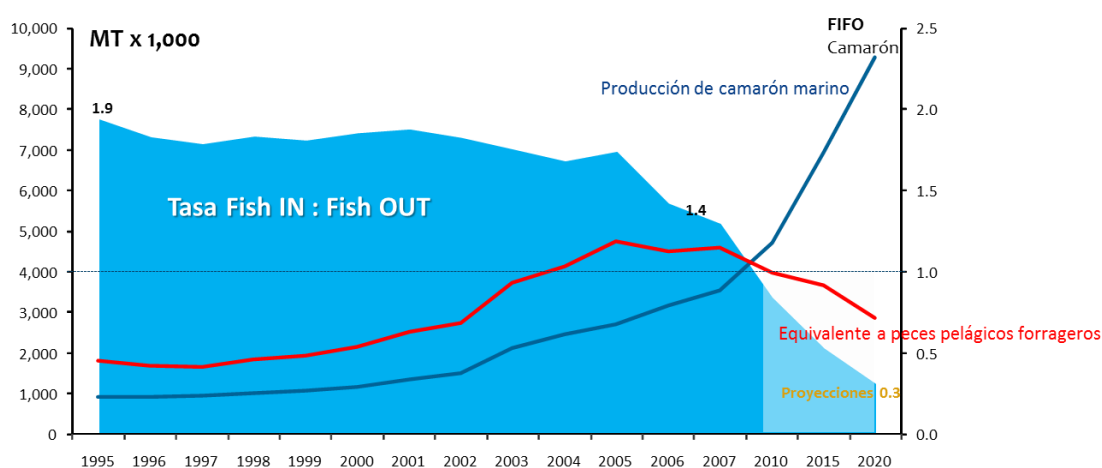
La HP y AP se han convertido en un elemento básico en las dietas acuícolas debido a sus muchos beneficios nutricionales (Tacon, 1993). La HP tiene un excelente balance de AAE y ácidos grasos, que reúnen las necesidades de los peces más producidos (Tacon, 1993). La HP, debido a sus características nutricionales únicas, se utiliza principalmente en la acuicultura hasta el 60% del consumo total, y el resto se distribuirá entre las industrias porcinas y avícolas (Jackson y Shepherd, 2010). En tanto que Tacon y Metian (2008) reportaron hasta un 50% el uso estimado de HP en la acuicultura. Sin embargo, también proyectan una disminución de la cuota de la HP en este sector.

Aunque sigue siendo un desafío reemplazar la HP y AP con ingredientes vegetales en dietas proporcionadas a especies carnívoras, sin embargo para especies omnívoras y herbívoros parecen muy adecuados para el consumo de dietas basadas en fuentes vegetales.

La consecución de fuentes alternativas de proteína para reemplazar el alto costo de la proteína marina debe ser el primer paso a identificar en el desarrollo de sistemas económicos para la acuicultura.

La proteína como componente de dieta para acuicultura, es el nutriente más costoso e importante para el crecimiento. HP y en menor grado calamar han sido tradicionalmente las principales fuentes de proteína animal marino en dietas para camarones. Aunque estas harinas son de alto valor nutritivo y generalmente incrementan la atractabilidad y palatabilidad de un alimento, pueden variar considerablemente en calidad y generalmente son costosas (Hardy y Masumoto, 1991). Se hace necesario por consiguiente encontrar fuentes alternativas de proteína de buena calidad, y que idealmente sean de un menor costo y fácilmente disponibles (D'Abramo y Lovell, 1991). Adicionalmente, a esto se ha sumado uno de los puntos más debatidos en la producción acuícola que es la relación FIFO (Fish in : Fish out) esto es la

utilización de la HP en el alimento y la cantidad de peces silvestres que se necesita para producir peces de piscifactoría. La última relación FIFO de crustáceos fue de 0,4 : 1 en 2010 publicada por Shepherd y Jackson (2013), lo que significó que se necesitó 0,4 toneladas de pescado silvestre para producir 1 tonelada de crustáceos considerando que la producción de crustáceos creció 232%. La relación FIFO de camarones no sólo es más bajo que lo previamente se ha sugerido, sino que ha venido disminuyendo de forma constante (Figura 3) de 1,9 en 1995 esperandose llegar a 0,3 en 2020.



**Figura 3.** Cambios en la relación FIFO y la producción global de camarón. Tomado de presentación de Nunes (2010)

Los alimentos comerciales de camarón contienen 30-50% de proteína cruda (PC), la cual proviene mayormente de productos de origen animal marino tales como HP y calamar (Mente *et al.*, 2002): Desde hace tiempo se ha planteado la necesidad de buscar nuevas fuentes proteicas a través de la evaluación experimental de materiales de origen vegetal y animal para obtener información acerca de su contenido y digestibilidad de nutrientes esenciales, con el propósito de incorporarlos en la alimentación de las distintas especies de camarones (Lim, 1996; Lim *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2002; Molina-Poveda y Morales 2004; Hanel *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2011; Martínez-Rocha *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012; Sá *et al.*, 2013).

### 1.2.1.- Leguminosas

Las leguminosas están consideradas como una de las fuentes principales de proteína de origen vegetal, y es indudable que la mayor atención se ha centrado en los estudios sobre la harina de pasta de soya como sustituta de la

proteína de origen animal (Akiyama, 1991). Este producto se utiliza principalmente en forma de harina de pasta desengrasada (DSM) pero se ha estudiado también el uso del grano entero sin desengrasar y últimamente también el concentrado proteico de soya (CPS).

Los productos de la soya son generalmente altos en proteína variando desde 45% para la harina de pasta de soya hasta aprox. 70% para el CPS, con un balance de aminoácidos considerados entre los más apropiados para las proteínas de origen vegetal aunque baja en metionina (Storebakken *et al.*, 2000).

Debido a la calidad nutricional, al costo relativamente bajo y a la consistente disponibilidad, la harina de soya es una de las proteínas de origen vegetal más utilizadas en la elaboración de alimentos comerciales para peces y camarones en el mundo (Treviño y Celis, 1995; Hardy, 1999). En camarones penaeidos como *L. vannamei*, *L. setiferus* y *L. schmitti* también ha sido demostrado a tolerar niveles de inclusión de soya hasta un 40 y 50 % en la dieta sin tener efecto adverso en el crecimiento (Lawrence *et al.*, 1986). Piedad-Pascual *et al.* (1990) evaluaron en juveniles *P. monodon* 5 niveles de DSM (15, 25, 35, 45 y 55%) en dietas con 40% de proteína y 10% de grasa cruda. Los camarones fueron instalados a una densidad de 10 o 20 por m<sup>2</sup> en jaulas de 1m<sup>2</sup> colocados en el fondo de un estanque de tierra y alimentados durante 3 meses. Independientemente de la densidad, no hubo diferencias significativas en las ganancias de peso de los camarones alimentados con los diferentes niveles de DSM. Por el contrario, reemplazar HP por DSM a niveles altos de inclusión reduce la tasa de crecimiento en algunas con un nivel de reemplazo del 30% (Akiyama, 1988). Lim y Dominy (1990) también observaron que más del 40% de reemplazo de proteína animal marina (compuesta de 53% HP, 32 harina de camarón y 15% harina calamar) por DSM (>28% de inclusión) redujo significativamente la tasa de crecimiento del *L. vannamei*. Sin embargo, en un estudio posterior utilizando DSM (17,7%) co-extruida con subproductos de aves se logró reemplazar hasta el 100% de HP (Samocho *et al.*, 2004). Sookying y Davis (2011) alimentando *L. vannamei* con una dieta que contenía 58% DSM y el 10% de granos secos de destilería (DDGS) como el reemplazo total de HP, informaron no tener diferencia en el peso final en comparación con

camarones alimentados con una dieta control conteniendo 10% de HP cuando se producen en estanques o tanques al aire libre suministrados con agua del estanque. Por otro lado, en un ensayo reciente de alimentación conducido para evaluar cinco niveles (0 a 33%) de incremento de soya por igual número de niveles de reducción de HP (40 a 16%) fue encontrado que la HP pudo ser reducida hasta 22% con 25% de soya sin que el crecimiento, retención y utilización de nutrientes por *Marsupenaeus japonicus* se vea afectado (Bulbul *et al.*, 2015)

El CPS es un producto que ha sido procesado para reducir las sustancias antinutricionales encontradas en la soya e incrementar el contenido de proteína cruda hasta niveles de alrededor de 62% lo cual es comparable al nivel proteico promedio de la HP (Paripatananont *et al.*, 2001).

Algunos estudios en peces demuestran que entre un 40-100% de proteína dietaria de HP puede ser reemplazada por CPS, sin tener influencia negativa en el crecimiento. Liu *et al.* (2000) demostraron que la inclusión del 8% de CPS como reemplazo de 22% de la HP incrementó la ganancia en peso del camarón tigre *P. monodon*, en 17% al final del período de prueba de 60 días. Paripatananont *et al.* (2001), examinaron la calidad nutricional del CPS en dietas para *P. monodon* reemplazando 0, 25, 50, 75 y 100% de HP por CPS sin suplementación de aminoácidos. Estos autores determinaron que después de ocho semanas el CPS pudo reemplazar hasta el 50% de HP sin efectos adversos en el crecimiento, ingesta alimenticia, FCR y mortalidad.

Basado en los estudios anteriormente descritos, hay diferencias entre especies y tamaño en la habilidad del camarón marino para utilizar nutricionalmente proteína de soya. En general, se sugiere que un 25-30% de nivel dietario de harina de soya sola como reemplazo del 40-50% de proteína marina animal es óptimo en alimentos para camarones (Swick *et al.*, 1995).

Otras fuentes de proteína de origen vegetal como son las semillas de leguminosas han sido evaluadas en camarones. Eusebio (1991) evaluó el uso de fréjol (*Vigna unguiculata*) y frijol de arroz (*Phaseolus calcaratus*) en *P. monodon*. La DAP no fue afectada al reemplazar 15,6% de la mezcla de proteína animal marino por proteína de leguminosa. Las dietas conteniendo

frijol de arroz descascarado tuvieron significativamente una mejor digestibilidad que el frijol de arroz no descascarado, en tanto que no se encontraron diferencias entre el fréjol descascarado o sin descascarar. Este resultado indica que la calidad de la proteína en si no es el factor limitante para el uso de estos productos como fuente alternativa de proteína, sino más bien la presencia de factores antinutricionales que dificultan la disponibilidad de estas proteínas como es en el caso del grano de arroz.

Las semillas altamente nutricionales de *Pisum sativum* han sido también evaluadas en dietas para camarones como el *Penaeus monodon* (Bautista-Teurel *et al.*, 2003). Estos estudios han demostrado que un nivel de inclusión de hasta 42% en camarones juveniles *P. monodon* no tuvo ningún efecto adverso en el crecimiento, supervivencia, y composición corporal del animal (Bautista-Teurel *et al.*, 2003). Por otra parte, en *L. stylirostris* y *L. vannamei*, la harina de guisante crudo o procesada por descascaramiento, extrusión o micronización tiene un uso potencial como fuente de energía y proteína (McCallum *et al.*, 2000). Con guisante extrudido se notó un pequeño aumento en la tasa de crecimiento y conversión alimenticia del *L. vannamei*, mientras que en *L. stylirostris* la extrusión causó una reducción en consumo de alimento sin efecto en la tasa de crecimiento y con mejoramiento de conversión alimenticia.

#### 1.2.2.- Oleaginosas

Los productos de canola (*Brassica sp.*) han sido utilizados en alimentos acuáticos con resultados alentadores (Gouveia y Davies, 1998), pero su valor potencial como ingredientes en alimentos para camarones han recibido poca atención (Buchanan *et al.*, 1997). Se ha observado que el proceso de extrusión mejora el valor nutritivo de la harina de canola e incrementa la concentración proteica (Sato *et al.*, 1998); también varios procedimientos de proceso pueden disminuir el contenido de factores antinutricionales en ésta. En un estudio de Cruz-Suárez *et al.* (2001), se evaluó el valor nutricional de harina de canola extruida y de guisante enteros, descascarados, extruidos, descascarados-extruidos y micronizados. Estos autores demostraron que la digestibilidad de proteína y materia seca de la dieta conteniendo canola extruida fue muy buena y similar a la dieta práctica que incluía HP de alta calidad. Estos resultados,

concuerdan con los de Buchanan *et al.* (1997), quienes reportaron que el nivel de inclusión (20%) de la harina de canola en dietas para *P. monodon* puede ser incrementado al 64% cuando una mezcla de enzimas es adicionada.

La harina de semilla de algodón (*Gossypium sp.*), generalmente menos costosa que la harina de soya, es ampliamente usada como un suplemento proteico en el ganado debido a su alto contenido de proteína (24%) y mayor disponibilidad (Mbahinzireki *et al.*, 2001). Sin embargo, en alimentación de camarones su uso es limitado por el contenido de gossipol. Fernández y Lawrence (1988), reportaron que la ganancia en peso y la supervivencia de postlarvas de *L. vannamei* y *L. stylirostris* no fueron afectadas cuando 20% de harina de semilla de algodón fue incluida en una dieta proteica de 30%. En un estudio, sustituyendo una base igual de nitrógeno con un 26,5% de harina de semilla de algodón por el 40% de una mezcla de proteína animal (53% harina pescado, 34% harina camarón, 13% harina calamar) en dietas para juveniles *L. vannamei*, Lim (1996) no observó un efecto negativo sobre su rendimiento general. La harina de semilla de algodón puede ser incluida en dietas para camarones pero no en los mismos niveles de la harina de soya. Otros estudios han demostrado que la habilidad de los camarones y los peces para utilizar harina de semilla de algodón varía dependiendo de la especie, composición de las dietas y nivel de gossipol libre particularmente al relacionarse con la calidad y cantidad proteica (Robinson y Li, 1995; Pavan Kumar *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2015).

Dayal *et al.* (2011) evaluaron la torta de girasol como reemplazo (0, 2,5, 5, 7,5 y 10%) de la HP en juveniles *P. monodon* criado tanto en tanques como en jaulas de red a salinidad 26-33 ppt. Los resultados mostraron reducciones en el crecimiento diario y eficiencia de utilización de la proteína en los camarones alimentados con dietas que tienen más de 2,5% de torta de girasol en tanques experimentales, pero se puede incorporar hasta un 5% en presencia de productividad natural sin comprometer crecimiento. Basado en este estudio, el máximo nivel de inclusión de la torta de girasol podría ser 5% para el camarón *P. monodon*.

### 1.2.3.- *Productos derivados de granos y cereales*

Otra área de interés es el potencial de variedades no-tradicionales de granos comunes como ingredientes especiales en alimentos acuáticos.

Un ingrediente alimenticio que muestra potencial para utilizarse en dietas acuícolas son los granos destilados con solubles (DDGS). Estos son los productos de sólidos solubles e insolubles de la producción de etanol a través de la fermentación del maíz los cuales tienen un significativo valor nutricional. Los DDGS tienen un porcentaje de proteína relativamente alto (26-30%). Esto es más alto que el maíz porque el almidón ha sido removido concentrándose la proteína y otros nutrientes. En un estudio llevado a cabo por Tidwell *et al.* (1993a), reportaron que los camarones *M. rosenbergii* alimentados con dietas conteniendo varios niveles de DDGS (0, 20 y 40%), no tenían diferencias en el peso promedio, supervivencia y tasa de conversión alimenticia. Tidwell *et al.* (1993b), trabajando con *M. rosenbergii*, encontraron que la sustitución del 50% o 100% HP con una combinación de harina de soya y DDGS no resultaron en una reducción en la ganancia de peso, la supervivencia y el rendimiento en comparación con la dieta que contiene sólo la HP. Estos resultados muestran que hasta el 40% de DDGS pueden ser utilizados en dietas. Los resultados demostraron que los DDGS son un ingrediente adecuado para incluirlo en dietas prácticas para camarones de agua dulce en estanques en niveles hasta del 40% de la formulación.

En un estudio llevado a cabo en acuarios bajo un sistema de recirculación de agua de mar clara, Cummins *et al.* (2013) alimentando camarones juveniles *L. vannamei* con dietas conteniendo DDGS (10, 20 o 30%) como reemplazo de HP no encontraron diferencia en el peso final y ganancia en peso en comparación con camarones alimentados con una dieta que contenía 52.5% SBM y 0% de HP pero si tuvieron un menor rendimiento que la dieta control con 20% de HP.

Otro cereal que ha mostrado mucho potencial para ser empleado en dietas para camarones es el grano de cebada, el cual ha sido tradicionalmente utilizado en la industria cervecera. Wu (1986) reportó que los granos destilados a base de cebada tenían 32,6% de PC, 6% de grasa, 4,4% de ceniza y 16,6% de fibra cruda. El efecto de los granos de destilería a base de cebada en

camarones fue investigado inicialmente a través de la directa adición a los estanques de cultivo, en donde se demostró que contribuye a la nutrición de *M. rosenbergii* (Kohler y Krueger, 1985). Molina-Poveda y Morales (2004) evaluaron una combinación (1:1 en base a proteína) de granos fermentados basados en cebada (GFC) y gluten de trigo (GT) en dietas para el juvenil *L. vannamei*. Cuatro dietas isocalóricas fueron formulados para contener 44% de proteína en la cual la proteína de GFC:GT reemplazo 0, 33, 66 y 100% de la proteína de origen marino (69% harina de camarón, 21% HP, 10% harina de calamar) en la dieta. Estos autores observaron que a medida que se incrementaba el GFC:GT y por ende los carbohidratos solubles la digestibilidad de materia seca, proteína y carbohidratos aumentaba no así el crecimiento, supervivencia y alimento no consumido, basado en esto concluyeron que se podría lograr una sustitución de la proteína animal marina de hasta un 16% en dietas con 44% de proteína para el juvenil *L. vannamei*. No obstante, el factor de conversión alimenticia, la tasa de eficiencia proteica y la DAP fueron estadísticamente iguales en las dietas conteniendo entre 0% y 32% de GFC:GT, lo que podría sugerir que si el balance de aminoácidos y la palatabilidad pueden ser mejorados, el nivel dietario del GFC:GT podría ser incrementado hasta un 32% sin que el crecimiento se vea afectado negativamente.

#### 1.2.4.- *Sub-productos avícolas*

Dentro de la gran variedad de fuentes de proteína utilizadas hasta el momento, los subproductos de la industria avícola no se les han brindado suficiente atención. La harina de sub-productos de aves tienen un perfil nutricional similar a la de la HP y por eso puede servir como un ingrediente aceptable en dietas para camarones (Cheng *et al.*, 2002a). En un estudio con *L. vannamei*, se ensayaron reemplazos de 33,3, 66,7 y 100% de HP por dos tipos de harinas derivadas de sub-productos de aves (harina regular y harina grado mascota con bajo grado de ceniza) en una dieta de 35,5% de proteína que contenía 24,5% de HP. Los resultados demostraron que hasta el 66,7% de HP podía ser reemplazada por harina regular sin afectar el crecimiento del camarón y la adición de AP a las dietas con harina regular desengrasada no afectó la composición corporal de del camarón (Cheng *et al.*, 2002a).



Entre estos sub-productos, la harina de plumas (FeM) es otra fuente proteica animal alternativa porque contiene más del 80% de proteína cruda (Cheng *et al.*, 2002b). Un estudio llevado a cabo en camarones *L. vannamei* por Cheng *et al.* (2002b) indicó que sin la suplementación de lisina y metionina cristalina, FeM hidrolizado por presión de vapor podría sustituir el 33% de la HP en el camarón blanco sin perder rendimiento. El nivel de sustitución podría aumentar a 66% completándolo con lisina y metionina. Cuando FeM se trató con una enzima desarrollada específicamente para hidrolizar FeM (Mendoza *et al.*, 2001), demostraron que el uso de un 20% de la mezcla FeM:DBM (2:1) permitió reducir en cerca de un 55% la HP en alimentos para *L. vannamei* podría ser reemplazado por FeM tratado.

#### 1.2.5.- Harinas de carne, hueso y sangre

La calidad de las harinas de carne y hueso (MBM) es muy variable y a veces limitada debido a un exceso de minerales y en los mejores casos contienen 45-60% de proteína de un buen valor biológico, aunque contienen cantidades limitadas de aminoácidos sulfurados (Guillaume *et al.*, 2001). Tan *et al.* (2005) midieron la respuesta de crecimiento del *L. vannamei* a la sustitución de HP por MBM. El peso ganado no fue afectado hasta 60% de reemplazo, pero hubo una reducción del 7% en la ganancia de peso al 80% de reemplazo. El FCR también se deterioró en un 9% en el mayor nivel de sustitución. En cambio, Forster *et al.* (2003) demostraron que de los 3 tipos de MBM ensayados, la tipo B la cual contenía 90% de carne de res presentó la mejor calidad nutricional para los camarones en términos de su habilidad para reemplazar HP hasta un 75% sin una reducción significativa en el crecimiento. Yang *et al.* (2004) reportaron que el reemplazo de HP por 50% MBM en dietas no afectó el rendimiento del *Macrobrachium nipponense*.

Por otra parte, la harina de sangre como reemplazo parcial proteico por HP en dietas de camarones causó disminución en el crecimiento para el *Penaeus californiensis* en todos los niveles de inclusión (5-10%) (Brand y Colvin, 1977). La harina de sangre también resultó ser inferior en las dietas para *Penaeus paulensis* cuando reemplazó HP, harina de camarón y de soya (Marchiori *et al.*, 1982). En otro estudio con camarones *L. vannamei* de 3-4g Dominy y Ako (1988) evaluaron cuatro productos de harina de sangre (secada por tambor, al

sol, al sol añadida metionina cristalina o secada al sol ligada covalentemente a la metionina) estos autores reportaron que el 15% podría ser sustituido por proteína marina en las dietas suministrados a *L. vannamei* sin ningún efecto sobre la supervivencia, el crecimiento el rendimiento y la utilización del alimento en comparación con el control. Sin embargo, Chookird *et al.* (2010) encontraron que la ganancia en peso, tasa de crecimiento específico, consumo de alimento y tasa de eficiencia proteica del juvenil *L. vannamei* disminuyeron con el incremento del nivel de sustitución de la harina de hemoglobina desde la sustitución más baja del 12,5% (4,3%) en comparación con la dieta de control. La supervivencia no fue estadísticamente diferente.

#### 1.2.6.- Fuentes vegetales no tradicionales.

Entre las fuentes no tradicionales empleadas en alimentos balanceados para acuicultura evaluadas están la harina de canola, colza, altramuz, gluten de maíz, arvejón entre otras. De estos estudios varios autores concuerdan que la harina de altramuz y gluten de maíz, por su alto contenido proteico y perfil de aminoácidos, se presentan como un potencial alimento para disminuir la inclusión de harina de pescado y soya.

##### a) Altramuz

El altramuz, conocido también como lupino o “chocho” (*Lupinus sp.*) es otra leguminosa empleada en nutrición animal considerado como una de las fuentes de origen vegetal con gran potencial a ser utilizado en alimentos acuícolas debido a su relativamente alto contenido de proteína (32-36% en base humedad), bajos costes y disponibilidad (Sudaryono *et al.*, 1999b). La proteína del altramuz es rica en aminoácidos esenciales lisina y leucina, aunque es deficiente en aminoácidos azufrados como la metionina y cisteína (Tabla 8), por ello se complementa con los cereales, consiguiendo un alimento con un buen balance de aminoácidos. Como la mayoría de los vegetales la harina de semilla de altramuz también contiene compuestos antinutricionales como inhibidores de proteasas, saponinas, fitoestrógenos y alcaloides, pero estos son reducidos o inactivados al someter al producto a un proceso de manufacturación (Francis *et al.*, 2001).

En Ecuador existe una gran diversidad de especies vegetales de alto valor proteico entre ellas el altramuz de la variedad *Lupin mutabilis* Swett que es utilizado como alimento para consumo humano y de animales; con un potencial productivo y perspectivas de uso como fuente de proteína, fijador de nitrógeno y productor de alcaloides por su uso en sanidad animal y vegetal.

El altramuz, es una leguminosa domesticada y cultivada por los antiguos pobladores de la región andina central desde épocas preincaicas hace más de 3500-4000 años, y está siendo usada para la alimentación humana debido a su propiedades nutricionales y funcionales (Duranti *et al.*, 2008).

Uno de los principales problemas que afronta el consumo del chocho es la presencia de alcaloides que le da un sabor amargo y que a la vez puede ser tóxico, por lo que para consumirlas es necesario extraer estas sustancias. Más del 93% de estos alcaloides de las semillas del altramuz son albina,  $\alpha$ -isolupanina, lupanina, esparteina, tetrahydrorhombifoline, 13-hidroxilupanina y 4-hidroxilupanina (Muzquiz *et al.*, 1994; Adler y Kittelson, 2004).

Los alcaloides como la quinolizidina interfieren con el funcionamiento de las células nerviosas (Francis *et al.*, 2001) y reducen la palatabilidad de la dietas que contienen el grano de altramuz crudo como lo reporta De la Higuera *et al.* (1988) en trucha arcoíris.

El proceso mínimo de transformación del altramuz es el desamargado (eliminación de alcaloides amargos). Tradicionalmente los campesinos procedían a desarmargar los granos de altramuz haciéndolo hervir por espacio de una hora aproximadamente y dejándolo en bolsas o sacos en la corriente de una acequia o en el río, por más de una semana. Otros métodos modernos como extracción simultánea de aceites y alcaloides por medio de alcohol han demostrado que son más costosos que el método tradicional.

Además de los alcaloides el altramuz contiene algunos factores antinutricionales como los inhibidores de proteasas que alteran los niveles de actividad de la tripsina y quimiotripsina, aunque en comparación a otras fuentes vegetales, el grano de altramuz posee una baja actividad de inhibición. El altramuz contienen cantidades significativas de oligosacáridos del tipo de los  $\alpha$ -

galactosidos, en el rango de 7 al 12% de materia seca (Trugo y Almeida, 1988), los cuales interfieren con la digestión de otros nutrientes, incrementan la producción de gas por el efecto osmótico en el intestino y la fermentación anaeróbica de los azúcares (van Barneveld, 1999).

**Tabla 8.** Contenido de aminoácidos (g/100g proteína) del *Lupinus mutabilis* Sweet comparado con el gluten de maíz.

	Altramuz	Gluten de Maíz
Ácido Aspártico	10,86	5,63
Treonina	3,65	3,41
Serina	5,07	4,95
Ácido glutámico	21,95	19,95
Prolina	4,11	10,25
Glicina	4,14	2,59
Alanina	3,54	8,69
Cistina	1,39	1,89
Valina	4,03	4,87
Metionina	0,75	1,79
Isoleucina	4,38	4,21
Leucina	7,18	16,55
Tirosina	3,54	0,56
Fenilalanina	3,70	5,60
Histidina	2,61	2,40
Triptófano	1,76	1,01
Lisina	5,30	2,61
Arginina	9,50	2,27

En Australia se han realizado numerosas investigaciones tendientes a evaluar el uso de altramuz (*Lupinus albus*) como sustituto proteico probando diferentes niveles de inclusión en peces como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y rodaballo (*Psetta máxima*) y en el camarón tigre (*Penaeus monodon*), concluyendo que el altramuz podría ser una potencial alternativa al uso de HP. Burel *et al.* (2000) evaluaron la harina de guisante extruido, altramuz extruido y semilla de colza en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y rodaballo (*Psetta maxima*). De las tres fuentes mencionadas el altramuz

extruido (*Lupinus albus*) resultó ser el suplemento más prometedor a la HP en trucha y rodaballo, obteniendo una DAP de 96 y 98%, respectivamente.

Robaina *et al.* (1995) reportaron que la HP puede ser remplazada hasta un 30% con harina de semilla de altramuz (*L. angustifolius*) sin disminuir significativamente el desarrollo en términos de eficiencia de proteína y crecimiento para juveniles de dorada (*Sparus aurata*). Burel *et al.* (2000) encontraron un crecimiento similar a la dieta control al incorporar el 50% de harina de altramuz extruido en trucha arcoíris. La harina de altramuz (*L. albus*) puede efectivamente reemplazar hasta el 75% de HP en dietas para juveniles *P. monodon* sin ningún efecto adverso en el crecimiento, supervivencia y composición corporal (Sudaryono *et al.*, 1999a). Estos resultados fueron confirmados por Smith. (2000) quién reemplazó hasta una cuarta parte de la proteína marina por altramuz (*L. angustifolius*) en la dieta sin reducir su productividad, factor de conversión alimenticia, tasa de eficiencia de proteína en *P. monodon*.

#### b) *Gluten de maíz*

El gluten de maíz (GM) es un subproducto del proceso de molienda húmeda del maíz que queda después de la extracción del almidón. Además de su alto contenido proteico (41-60%) la harina de GM es baja en fibra, cenizas (Tabla 9) y no tiene factores antinutricionales (Regost *et al.*, 1999; Pereira y Teles, 2003). Aunque deficiente en lisina, es una valiosa fuente metionina (Tabla 8) utilizadas para complementar otras fuentes proteicas, además su alto contenido de xantofilas lo hace un valioso elemento de pigmentación en alimentos de aves de corral aunque esto puede ser un limitante en peces que pueden pigmentarse en amarillo por sobre cierto niveles de inclusión.

**Tabla 9.** Análisis proximal de harina de gluten de maíz comercial de 60% de PC.

<b>Análisis</b>	
Materia Seca	90 %
Proteína Cruda	60,0 %
Grasa	2,5 %
Fibra Cruda	2,0 %
Calcio	4,5 %
Fósforo	0,5 %
Xantofilas	496 mg/Kg
Total los Nutrientes Digeribles	83,0%

Actualmente existe poca información sobre la incorporación de GM en dietas para especies acuícolas y las existentes son estudios realizados en peces, en donde se han evaluado diferentes niveles de reemplazo, obteniéndose buenos resultados en el crecimiento y digestibilidad. Varios estudios atribuyen al GM una buena digestibilidad. En dietas que contenían 20% de harina de GM para rodaballo (Regost *et al.*, 1999) y trucha arcoíris (Morales *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1995) determinaron una muy buena digestibilidad aparente de proteína de la dieta. Wu *et al.* (1995) también obtuvieron una alta digestibilidad de proteína del 97% en dietas para tilapia.

Por otra parte existen estudios que evalúan la inclusión de harina de GM para peces en dietas combinadas con harina de soya. Así Watanabe *et al.* (1993) encontraron que el reemplazo de la HP en un 91% por una combinación de 15% de harina de GM, 30 % de soya y 15% de carne resulta económicamente beneficioso al obtener una DAP del 93.5% en trucha arcoíris. En un trabajo muy similar Pongmaneerat *et al.* (1993) combinaron los mismos insumos para carpas, adicionando algunos aminoácidos esenciales para mejorar la atractabilidad y palatabilidad, obteniendo una sustitución del 56% de HP con una inclusión de 25% de harina de soya y 10% de GM, obteniendo una digestibilidad de proteína aparente de 90%.

### c) *Amaranto*

El grano de amaranto (*Amaranthus sp.*) tiene un contenido proteico que va de 12 a 18% (Tabla 10) y es más alto que otros granos de cereales, con un contenido de lisina significativamente alto lo cual lo hace particularmente atractivo para incrementar el valor biológico de alimentos procesados (Pedersen *et al.*, 1987a). La semilla del amaranto posee un buen balance de aminoácidos esenciales con respecto a otros cereales (Teutonico y Knorr, 1985) y hay varios trabajos acerca de la calidad nutricional excepcional de la proteína similar a la caseína de la leche (Singhal y Kulkarni, 1988).

Los carbohidratos en el grano de amaranto consisten principalmente de almidón compuesto de fracciones aglutinantes y no-aglutinantes. El único aspecto diferencial del almidón del amaranto es que el tamaño de sus gránulos

(1 a 3um) es más pequeño que los de otros cereales. Debido a este tamaño y a la composición del almidón del amaranto, se sugiere que el almidón posee una gelatinización única la cual podría ser de beneficio a la industria alimenticia (Lehman, 1988). El grano de amaranto tiene un contenido de energía similar a la de los granos de cereales y alrededor del doble de la cantidad proteica, con una composición aminoácidica superior (Tabla 10). El grano sirve como un sustituto adecuado por el grano de maíz en alimento para aves y puede reemplazar parcialmente los costosos ingredientes proteicos de animales (Kabuage *et al.*, 1996). Un estudio llevado a cabo para determinar el efecto de dietas de granos de amaranto pelletizados a vapor con y sin melaza, demostró que los pollos alimentados con dietas que contenían 20% fueron más pesados que aquellos con 40% de inclusión. El pelletizado mejoró el peso corporal, la ingesta de alimento y la eficiencia alimenticia, mientras que la inclusión de la melaza no fue efectiva en estimular la ingesta de alimento (Kabuage *et al.*, 1996). La utilización del grano mejoró con la edad de las aves, demostrando que el grano de amaranto crudo podía ser más adecuado como un ingrediente en las dietas finales de pollos para engorde.

Hay algunos informes sobre el uso de amaranto en alimentos acuícolas. Virk y Saxena (2003) utilizando semillas de amaranto como sustitución de salvado de arroz y torta de aceite de cacahuete fueron estudiados en tres niveles diferentes (20, 35, 50%) en dietas para la carpa común, *Cyprinus carpio* y rohu, *Labeo rohita*, bajo un sistema de producción semi-intensiva. El crecimiento en términos de ganancia de peso corporal fue máximo en los peces alimentados con dietas que contienen 20% de semillas de amaranto. En general, los peces alimentados con dietas que contenían a diferentes niveles mostraron mejor crecimiento que el control, a causa de la buena calidad proteica disponible en las semillas de amaranto. Adewolu y Adamson (2011) evaluaron harina de hojas de *Amaranthus spinosus* como fuente de proteínas en la dieta para *Clarias gariepinus*. Harina de hojas de amaranto fue incluido en las dietas prácticas a los 0, 5, 10, 15 y 20% y se suministraron a alevines de 5 g por 56 días. Los resultados indicaron que hasta un 5% de harina de hoja *A. spinosus* podría incluirse en la dieta práctica de *Clarias gariepinus* sin afectar el crecimiento y la utilización del alimento.

d) *Quinoa*

*Chenopodium quinoa* (quinua) es un grano originario de las tierras altas de América del Sur, fue el cultivo más importante después de la papa para el Imperio Inca (Cusack, 1984). La quinua contiene todos los aminoácidos esenciales (Tabla 10), es rica en fibra y vitaminas del grupo B y no contiene gluten (Olsen, 2002). Es considerada por la FAO y la Organización Mundial de la Salud como un alimento único por su alto valor nutricional. La quinua al igual que el amaranto tiene un mayor contenido proteico (12-19%) que cualquier otro cereal y es alto en lisina (6,7% de PC) como en metionina (2,9% de PC) (Galway *et al.*, 1990; Ahamed *et al.*, 1998). Tiene un balance nutricional excepcional de proteína, grasa y almidón. El embrión abarca una gran proporción de la semilla más que en cereales normales, por eso el contenido proteico es alto.

**Tabla 10.** Contenido de aminoácidos (g/100g proteína) de amaranto, quinua comparado con harina de pescado.

	<b>Amaranto</b>	<b>Quinoa</b>	<b>Harina de Pescado</b>
Humedad (%)	3,83	9,59	6,46
Proteína (Nx6,25) (%)	17,47	15,44	70,3
Lípidos (%)	6,49	8,34	12,05
Fibra (%)	1,38	0,91	--
Cenizas (%)	2,82	2,53	11,75
Calcio (%)	0,09	0,06	1,96
Fosforo (%)	0,74	0,73	1,94
Energía (MJ/Kg)	20,04	20,12	20,38
<b>Aminoácidos</b>			
Arginina	10	7,4	5,47
Histidina	2,5	4,6	2,46
Isoleucina	3,7	7	3,69
Leucina	5,7	7,3	7,38
Lisina	8	8,4	8,07
Metionina	4,2	5,5	3,01
Fenilalanina	7,7	5,3	3,96
Treonina	3,6	5,7	4,37
Valina	4,3	7,6	4,78



Respecto a los carbohidratos, la semilla contiene de 58-68% de almidón y 5% de azúcar. Los gránulos de almidón son extremadamente pequeños 0,8-1,5  $\mu\text{m}$ , contienen alrededor del 11% de amilosa y se gelatinizan en un rango de 55-65 °C (Koziol, 1992). Improtta y Kellems (2001) evaluaron cuatro ensayos para determinar el efecto que podía tener sobre el desempeño y supervivencia de pollos de engorde diferentes métodos de procesamiento de quinua (cruda, lavada y pulida) en comparación con dietas basadas de trigo, maíz y sorgo. Los pollos que recibieron la quinua lavada tuvieron un desempeño cercano al de aquellos que recibieron dietas a base de harina de maíz y soya. El lavado pareció ser más efectivo que remover la cáscara externa. Al elevar el nivel proteico de la dieta de 13,2 a 18 o 23% se demostró que mejoró el crecimiento y supervivencia en los grupos alimentados con quinua. Los resultados de estos ensayos indicaron que el lavado y pulido de las semillas de la quinua previos a la alimentación, incrementó el nivel de la PC reduciendo ligeramente la cantidad de quinua presente en la dieta; al añadir DSM mejoró el crecimiento y supervivencia de los pollos (Improtta y Kellems, 2001). Solamente algunos trabajos están disponibles relacionados con las características alimenticias de la quinua y las respuestas han sido inconsistentes.

Es importante destacar que para el empleo de proteína de origen vegetal se debe conocer el perfil de aminoácidos de la(s) materia(s) prima(s) a emplear, por la deficiencia de algunos de ellos, por ejemplo metionina, cisteína y treonina en el caso de la harina de soya, lisina con los granos de destilería (Tudor *et al.*, 1996). Además de la posibilidad de mejorar el valor nutricional de un ingrediente alimenticio mediante la adición de enzimas, como el resultado obtenido por Buchanan *et al.* (1997), quienes adicionando una mezcla enzimática a dietas conteniendo harina de canola, mejoraron la ganancia en peso del *P. monodon*.

La sustitución de la harina de pescado en la alimentación de camarones marinos está asumiendo mayor importancia debido al aumento de las consideraciones económicas y ecológicas. De acuerdo a estas consideraciones la acuicultura podría disponer de potenciales fuentes proteicas para sustitución de la HP, razón por la cual el presente trabajo valoró el potencial de altramuz,

gluten de maíz, amaranto y quinua como sustitutos de la HP en dietas usadas en la alimentación del *L. vannamei*

### **1.3.- OBJETIVOS**

#### **1.3.1 General**

El presente trabajo de investigación se diseñó para evaluar el potencial del altramuz, gluten de maíz, quinua y amaranto como fuentes de proteína vegetal en alimentos prácticos para camarones *L. vannamei*.

#### **1.3.2 Específicos**

- Establecer si la proteína del altramuz, gluten de maíz, amaranto o quinua pueden sustituir total o parcialmente la proteína de la harina de pescado sin afectar el crecimiento, supervivencia y la conversión alimenticia del camarón juvenil *L. vannamei*.
- Evaluar el reemplazo de la harina de pescado usando el altramuz como principal fuente de proteína en dietas bajo condiciones del estanque.
- Determinar el consumo de los alimentos motivo de está investigación por parte de los camarones.
- Valorar la digestibilidad de materia seca y proteína de las dietas experimentales ensayadas en esta investigación y suministradas al camarón.
- Evaluar la digestibilidad de los aminoácidos de las dietas experimentales conteniendo gluten de maíz

### **1.4 HIPOTESIS**

El altramuz, gluten de maíz, amaranto o quinua serán fuentes de proteína vegetal que en reemplazo de la proteína de la harina de pescado en dietas para engorde no afectaran negativamente el crecimiento y supervivencia de camarones.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1.- Procesamiento de ingredientes dietarios

##### 2.1.1 *Eliminación de alcaloides*

El grano de *Lupinus mutabilis* Sweet fue remojada en agua corriente por 48 horas. Los granos remojados fueron luego cocinados en agua a ebullición por 40 minutos. Estos fueron escurridos y lavados en agua potable y remojados en agua corriente de mar por 4 días. Este proceso elimina los alcaloides que dan el sabor amargo del grano de chocho.

Los granos de altramuz fueron sometida al proceso de descascarado para reducir el contenido de fibra. Después del tratamiento, la semillas fueron secadas a 40°C toda la noche.

##### 2.1.2 *Extracción de aceite*

El aceite del altramuz fue extraído siete veces consecutivas con dietil eter (2:1) bajo agitación a 135 rpm durante 3 horas, seguido por la remoción del solvente que fue descartado.

En el caso del amaranto los lípidos fueron extraídos con dietil éter por agitación continua a 190 rpm durante tres horas en un agitador New Brunswick Scientific. Este proceso se repitió tres veces descartándose el solvente con grasa en cada ocasión.

En ambos casos se permitió que el solvente se evaporara inicialmente a temperatura ambiente dentro de una sorbona para posteriormente mantener el amaranto en una estufa a 60°C por 24 horas. Posteriormente fue pulverizando para producir la harina de altramuz y amaranto.

##### 2.1.3 *Remoción de la saponina de la quinua*

El grano de quinua *C. quinoa* se enjuagó en agua limpia tres veces, retirando de ese modo la cáscara y, por tanto, la saponina, que es un factor anti-nutricional. Los granos fueron entonces drenados y secados en un horno durante 24 horas. Al igual que otros ingredientes, la quinua y el amaranto se pulverizaron a 300 um.

## 2.2.- Dietas experimentales

Se prepararon dos grupos de dietas experimentales de 35% de PC, en las que porcentajes 0, 25, 50, 75 y 100 % de proteína de HP fue sustituida por proteína vegetal, el primer grupo con harina de altramuz, y el segundo con harina de gluten de maíz.

Adicionalmente dos conjuntos de dietas experimentales se prepararon con un nivel de 30% de PC, incluyendo una dieta de control sin proteína vegetal, en el que la HP fue sustituida por proteína vegetal 15, 25, 35 y 45%, el primer grupo por harina de amaranto y el segundo por harina de quinua. Además, una dieta comercial (32,6% de PC y 7,2% de lípidos) se puso a prueba como referencia externa.

El nivel de lípidos fue ajustado variando el nivel del AP y las formulas de las dietas fueron balanceadas hasta 100% con almidón de maíz. La composición de las dietas se observa en las tablas 11, 12 y 13.

**Tabla 11.** Formulación de las dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de la harina de pescado por altramuz.

Ingredientes	LKM 0	LKM25	LKM50	LKM75	LKM100
Harina de pescado	32,91	24,68	16,46	8,23	0,00
Harina de calamar	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Harina de altramuz	0,00	9,12	18,25	27,37	36,50
Aceite de pescado	5,28	5,71	6,17	6,63	7,08
Lecitina de soya	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Colesterol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premezcla de Vitaminas	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Premezcla de Minerales	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Antioxidante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Antihongo	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Carboximetil celulosa	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Astaxantina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Gluten de Trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Almidon de Maiz	36,46	35,63	34,27	32,92	31,57
Oxido de cromo	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

**Tabla 12.** Formulación de las dietas experimentales con diferentes niveles de reemplazo de la harina de pescado por gluten de maíz.

<b>Ingredientes</b>	<b>CGM0</b>	<b>CGM25</b>	<b>CGM50</b>	<b>CGM75</b>	<b>CGM100</b>
Harina de pescado	32,91	24,68	16,46	8,23	0,00
Harina de calamar	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Harina de gluten de maíz	0,00	8,64	17,28	25,92	34,56
Aceite de pescado	5,28	5,70	6,15	6,60	7,04
Lecitina de soya	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Colesterol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premezcla de Vitaminas	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Premezcla de Minerales	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Antioxidante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Antihongo	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Carboximetil celulosa	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Astaxantina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Gluten de Trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Almidón de Maíz	36,44	35,61	34,74	33,88	33,03
Oxido de cromo	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

**Tabla 13.** Formulación de las dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de la harina de pescado por amaranto y quinua.

<b>Ingredientes</b>	<b>AQ0</b>	<b>A15</b>	<b>A25</b>	<b>A35</b>	<b>A45</b>	<b>Q15</b>	<b>Q25</b>	<b>Q35</b>	<b>Q45</b>
Harina de pescado	31,56	26,83	23,67	20,52	17,36	26,83	23,67	20,52	17,36
Harina de calamar	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Amaranto	0,00	18,45	30,75	43,04	55,34	0,00	0,00	0,00	0,00
Quinua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,85	34,74	48,64	62,54
Aceite de pescado	3,48	2,84	2,42	2,00	1,58	2,35	1,60	0,84	0,09
Lecitina de soya	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Premezcla de Vitaminas	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Premezcla de Minerales	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Antioxidante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Colesterol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Carboximetil celulosa	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Gluten de Trigo	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Almidón de Maíz	45,09	32,01	23,29	14,57	5,85	30,11	20,12	10,13	0,14
Antihongo	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Oxido de cromo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	100	100	100	100	100	100,01	100	100	100

Todas las dietas experimentales fueron preparadas mezclando los ingredientes manualmente, las vitaminas y minerales fueron mezcladas con el resto de los ingredientes secos en una mezcladora vertical con la lecitina antes de añadir el aceite de pescado, Como último paso se adicionó agua caliente, incorporando gradualmente hasta resultar una masa que pudo ser procesada en un molino de carne Oster <sup>TM</sup>. Los fideos de 2mm de diámetro fueron secados en una estufa vertical a 60 °C y empacadas en fundas plásticas a -10 °C hasta su uso.

### **2.3.- Ensayo de crecimiento en el laboratorio**

Camarones *L. vannamei*, libres del virus de mancha blanca (WSSV), obtenidos de una maduración controlada, fueron criados en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), durante un mes. Acuarios de 50 L (60 cm largo x 30 cm de altura x 36 cm de ancho y área del fondo de 0,18 m<sup>2</sup>) fueron cubiertos en la parte superior con una malla de 2 mm para prevenir el salto de los camarones hacia fuera. Dependiendo del ensayo realizado ocho (altramuz y GM) o siete (amaranto y quinua) juveniles *L. vannamei* fueron instalados en los acuarios (44 ind. m<sup>-2</sup> o 39 ind. m<sup>-2</sup>) y aclimatados en condiciones de laboratorio por dos semanas. Después de este período de adaptación, los camarones fueron pesados y cada camarón perdido durante la primera semana fue reemplazado por otro de peso similar al promedio que estuvo alrededor de 1,2-1,3 g. Seis repeticiones se realizaron para cada tratamiento.

Los camarones fueron alimentados *ad libitum*. Las heces y el exceso de alimento de los acuarios fueron sifoneados antes de la primera alimentación. Cada quince días eran pesados los camarones de cada acuario y se limpiaban completamente los mismos.

En un sistema de flujo continuo el recambio de agua en cada acuario fue ajustado para mantener una buena calidad de agua, la cual fue monitoreada 2 veces a la semana durante el periodo de ensayo, incluyendo la temperatura del agua, salinidad y oxígeno disuelto. El rango de temperatura de los experimentos estuvieron entre 25 y 29 °C, el oxígeno disuelto entre 4,4 y 6,7 mg/L y la salinidad se mantuvo en 35 ppm. El fotoperiodo fue de 12h de luz y 12h oscuridad (09h00-21h00).

## 2.4.- Ensayo de crecimiento en campo

En el caso particular del altramuz, con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el bioensayo de laboratorio y determinar la contribución de la productividad natural y alimentos experimentales al balance nutricional general de camarón, un experimento bajo condiciones comerciales se llevó a cabo. El ensayo de crecimiento se llevó a cabo en jaulas sin fondo (1 m<sup>2</sup> de superficie y 1,50 m de altura) situadas en un estanque de 1.000 m<sup>2</sup> dentro de invernadero. Las jaulas fueron hechas con malla de polietileno (15 x 20 mm de apertura) y fueron enterrados aproximadamente 20 cm y entre ellas separadas a 40 cm. De acuerdo a la densidad usualmente utilizada en la granja, 30 camarones juveniles de *L. vannamei* fueron colocados en cada jaula.

El alimento fue ofrecido en un comedero a razón de 6,5% (5,5 a 9 g), 6% (9 a 11,5 g) y 5,5% (11,6 g de la cosecha) de la biomasa, dos veces al día durante 45 días. Cinco repeticiones se realizaron para cada tratamiento. Además, cinco jaulas con camarones, pero sin suministro de alimentación (NF), se colocaron en el estanque. Las cinco dietas y el control sin alimentar, así como los animales, fueron asignados aleatoriamente a las 30 jaulas.

No hubo recambio de agua en el estanque, sin embargo, se compensó la pérdida de agua causada por la filtración y evaporación. Parámetros abióticos tales como la concentración de oxígeno disuelto ( $8,7 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ ) y la temperatura ( $33 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en el agua fueron monitoreados diariamente a las 06h00. La intensidad de la luz dentro del invernadero, medido por una luxómetro lux / fc (modelo 840.022, Sper Scientific Ltda., USA cada día durante el período experimental, fue  $25.474,9 \pm 19.287 \text{ lx}$ . Las jaulas se muestrearon con una frecuencia semanal para estimar el peso promedio y ajustar la cantidad de alimento. Al final del periodo experimental se contaron y se pesaron para estimar el FCA, supervivencia, biomasa obtenida y el peso promedio final de los camarones en cada una de las jaulas.

## 2.5.- Parámetros de rendimiento

A los datos obtenidos se les aplicaran las siguientes fórmulas de cálculo para determinar la Tasa de Crecimiento Específica (TCE) y FCA.

Tasa de crecimiento específico ( %/día)

$$TCE = \left[ \frac{\ln W_{x_f} - \ln W_{x_i}}{t(\text{días})} \right] \times 100$$

Factor de Conversión alimenticia

El FCA fue calculado en base a la fórmula de Brand y Colvin (1977) en base a la cantidad de alimento suministrado para la biomasa producida considerando los camarones muertos.

$$FCA = \frac{\text{total alimento ingerido}}{\text{Biomasa ganada} + \left( \frac{W_{x_f} + W_{x_i}}{2} \right) \times \text{animales muertos}}$$

$W_{x_i}$ = peso promedio inicial

$W_{x_f}$ = peso promedio final

Una estimación del porcentaje de la Contribución de la Productividad Natural (CPN) a los requerimientos nutricionales se hizo utilizando la siguiente ecuación:

$$CPN = 100 - [(W_{x_f} - W_{x_i}) \text{ camarón sin alimentar} / (W_{x_f} - W_{x_i}) \text{ camarón alimentado}] * 100$$

## 2.6.- Estabilidad de dietas

La estabilidad de las dietas se determinó mediante el método de agitación horizontal usando para ello un agitador con controlador de temperatura. Dos gramos de la dieta a evaluar se colocaron en botellas que contenían 100 ml de agua de mar a 35 ppt. Las botellas fueron mantenidas en un baño María (28°C) con agitador (Eyela NTS-120, Japón) a una velocidad de agitación de 70 rpm. Luego de dos horas de agitación se recogió el alimento en rejillas



metálicas de ojo de malla de 1 mm, taradas previamente, para ser secadas durante 24h a 60°C y posteriormente pesadas para determinar la estabilidad de las dietas en términos de Retención de Materia Seca (RMS).

$$RMS = 100 - \left( W_{\text{seco}}_{\text{antes de la inmersión}} - W_{\text{seco}}_{\text{después de la inmersión}} \right) \times 100$$

## 2.7.- Tasa de ingestión

Durante las dos semanas previas a la terminación del ensayo de crecimiento los camarones alimentados *ad libitum* a las 08h00 y 16h00 después de 2 horas de haber sido suministrado se empezó a coleccionar el alimento sobrante durante varios días consecutivos. El remanente del alimento fue secado a 60 °C por 24h para determinar la palatabilidad del alimento. Adicionalmente se realizó el mismo procedimiento bajo las mismas condiciones en acuarios sin animales para calcular el factor de pérdida de alimento por lixiviación, el movimiento del agua, la aireación, sifón y lavado durante el tiempo que el alimento estuvo en el agua como un factor de corrección (F).

La cantidad de alimento consumido por el camarón se expresó como un porcentaje de la biomasa de camarón en los acuarios que es calculado como la cantidad de alimento suministrado en relación al peso corporal del camarón, fue utilizado como un indicador de la palatabilidad de la dieta usando las siguientes expresiones.

$$Palatabilidad = \left[ \frac{\text{alimento suministrado} - (\text{alimento consumido} \times F)}{\text{biomasa del acuario}} \right] \times 100$$

$$F = \frac{\text{alimento suministrado}}{\text{alimento recuperado}}$$

En tanto que la tasa de ingestión diaria (TID, %/día) fue calculado con la ingestión corregida del alimento usando la siguiente expresión:

$$TID = \left[ 100 \times \left( \frac{\text{Alimento corregido/ Biomasa promedio}}{t \text{ (días)}} \right) \right]$$

## 2.8.- Ensayo de digestibilidad

Al final de las 8 semanas de alimentación con las dietas experimentales se pesaron individualmente los animales y fueron devueltos a los acuarios para continuar con el ensayo de digestibilidad. Después de 15 días de suministrar las dietas con 0,5 % de Oxido de Cromo como un marcador inerte. Se empezó a coleccionar las heces 120 minutos después de haber alimentado en forma continua (8h30 y 14h00), sifoneando 30 minutos antes los restos de alimento. El material fecal fue enjuagado con agua dulce y destilada y transferido a tubos eppendor® para ser centrifugadas a 13500 rpm, 4°C por 5 minutos. Una vez eliminado el líquido sobrenadante las heces fueron almacenadas a -80 °C para luego ser liofilizadas por 24 horas y pulverizadas manualmente mantenidas a -20 °C en un medio seco.

Digestibilidad Aparente de Materia Seca

$$DAMS = \left[ 1 - \left( \frac{\% Cr_2O_3 \text{ en alimento}}{\% Cr_2O_3 \text{ en las heces}} \right) \right]$$

Digestibilidad aparente de Proteína

$$DAP = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{(\% Cr_2O_3 \text{ en alimento})}{(\% Cr_2O_3 \text{ en alimento})} \times \frac{(\% \text{ proteína en alimento})}{(\% \text{ proteína en las heces})} \right) \right]$$

## 2.9.- Análisis bioquímicos

Las muestras de los ingredientes y dietas pulverizadas y homogenizadas fueron analizadas siguiendo los métodos recomendados por la AOAC (1990). La humedad se determinó secando a 105 °C por 2h, cenizas por incineración a

550 °C por 4h, grasa cruda por extracción con éter dietético (Técnica Soxhlet), proteína (%Nx6,25) por el método de Kjeldahl.

Las dietas secas y heces liofilizadas fueron analizadas por óxido de cromo (Mc Ginnisy Kasting, 1964) y proteína (Foster y Gabbot, 1971). Aminoácidos fueron determinado por cromatografía líquida de alta precisión (Shimadzu, Japan) después de hidrolizar las muestras con ácido clorhídrico 6 N por 24 h a 110 °C para posteriormente derivatizar las muestras con o-phthaldialdehyde (OPA) de acuerdo a Antoine *et al.* (1999).

## **2.10.- Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con el programa Statgraphics (Statistical Graphics System, Version Centurion, Herndon, VA, USA). La Tasa de Crecimiento Específica, biomasa, sobrevivencia, digestibilidad, y todas las variables evaluadas fueron sometidas al análisis de Normalidad usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la prueba Hareley-Cochran-Bartlett para encontrar Homogeneidad de Varianza. Todos los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $P < 0,05$ ), considerando el peso inicial como covariable. Todas las variables a excepción del FCA y el peso final, fueron transformadas por arcoseno. Las diferencias entre tratamientos fueron establecidos usando la prueba de student-Newman-Keul a un nivel de probabilidad de 0,05.

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets

Cesar Molina-Poveda<sup>1</sup>, Mariela Lucas<sup>1</sup>, Miguel Jover<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENAIM-ESPOL. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Campus Gustavo Galindo. Km. 30.5 Vía perimetral. P.O. Box 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. E-mail: [cmolinapoveda@gmail.com](mailto:cmolinapoveda@gmail.com)

<sup>2</sup> Biodiversity and Aquaculture Group. Institute of Animal Science and Technology. Universitat Politècnica de Valencia. Camino de Vera, s/n. 46071 Valencia (Spain). E-mail: [mjover@dca.upv.es](mailto:mjover@dca.upv.es)

**Corresponding author:** Cesar Molina-Poveda. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Campus Gustavo Galindo. Km. 30.5 Vía perimetral. P.O. Box. 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. (Actually in GISIS. km 6.5 vía Duran – Tambo. P.O. Box 09-12-4678. Guayaquil, Ecuador). E-mail: [cmolinapoveda@gmail.com](mailto:cmolinapoveda@gmail.com)

#### Abstract

Two growth trials were conducted with juvenile *Litopenaeus vannamei* using experimental diets providing 35% protein and 11% lipid, where 0, 25, 50, 75 and 100% of fish meal protein (FM) was substituted by lupin kernel meal (LKM). Before grinding the lupin seeds, the alkaloids, hull and fat were removed by specific methods. In an indoor clear water aquarium trial, juvenile shrimp (initial weight  $1.23 \pm 0.22$  g) were stocked at 8 per 50 L aquarium, with 6 replicate aquaria assigned to each treatment in a completely random design. At the end of the 57-day feeding trial, the average survival of the shrimp was >80% and there was no variation ( $P>0.05$ ) when FM was replaced partially nor totally with LKM. The results of this study showed that LKM can replace 50% of FM protein without significantly discouraging growth (6.7-7.0 g final weight) ( $P>0.05$ ), but

the substitution of 75 and 100% resulted in lower growth (4.8-5.2 g final weight). The inclusion of LKM at any of the tested levels resulted in a statistical reduction ( $P < 0.05$ ) of the apparent dry matter digestibility (ADMD) and apparent protein digestibility (APD) of the feed. The gradual increases of LKM in diets produced a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in ingestion rate. To demonstrate the inherent effects of water quality and natural food sources found in shrimp ponds, a growth trial was conducted in 1-m<sup>2</sup> bottomless cages in a single 1000-m<sup>2</sup> pond greenhouse. Juveniles weighing  $5.84 \pm 0.25$ g (mean  $\pm$  SD) were stocked in the cages at a density of 30 individuals per m<sup>2</sup>. The feed was offered on a tray twice a day for 45 days. Five replicates were performed for each treatment. At the end of the 45-day field evaluation, no significant differences ( $P > 0.05$ ) in final weight (11.1-12.2g), specific growth rate (1.4-1.6 % day<sup>-1</sup>), survival (69-79%) nor FCR (2.0-2.3) were found in any of the experimental shrimp diets. These findings show that *Lupinus mutabilis* Sweet has very good potential as an alternative protein source replacing at least 50% of protein from FM, equivalent to one third of the total protein in the diet for growth-out phase of *L. vannamei*. The study should be repeated under pond conditions to corroborate results obtained in cages and assess the cost benefit of including this ingredient in commercial feeds.

**Keywords:** Plant protein; shrimp growth; bottomless cages; ponds

## 1. Introduction

The constant growth of aquaculture at a worldwide level to a rate of up to 9 % year on year (Tacon and Metian, 2008), has produced an increase in the demand for feeds for commercial aquatic species. A fundamental part of the processing of these feeds has been fish meal, a protein source of high nutritional value and palatability that usually constitutes between 5 to 40% of the manufactured shrimp feeds (Tacon and Metian, 2008). Global exploitation of this resource, the average production of which in the last decade fluctuated between 5 and 7 million metric tons (Tacon and Metian, 2008) is becoming greater and greater, and if in addition we consider the fact that the processing of this raw material is affected by adverse climatologic conditions like El Niño, we could consider fish meal a marine protein source of high commercial value, as

the latest price data indicates, at around 2100 US\$/ton (www.indexmundi.com). However, uncertain availability and fluctuations in its cost and quality have led to a worldwide search for new alternative protein sources for both shrimp and fish feeds.

With the intention of finding alternatives that allow the replacement of fish meal, numerous investigations have been carried out to evaluate protein substitutes in *L. vannamei* shrimp diets. Experimental aquafeeds have been formulated, where the marine protein is replaced by plant protein sources such as soy bean (Lim and Dominy, 1990, 1992; Davis et al., 2004), cottonseed (Lim, 1996), canola meal (Lim et al., 1997), pea meal (Davis et al., 2002; Martínez-Rocha et al., 2012), barley-based fermented grains (Molina-Poveda and Morales, 2004), a mixture of plant and poultry by-products (Amaya et al., 2007a,b), algae (Hanel et al., 2007; Ju et al., 2009), a mixture of plant protein soybean, canola and millo (Suárez et al., 2009; Sookying and Davis, 2011), Jatropha kernel meal (Harter et al., 2011), soy protein concentrate (Sá et al., 2012; Bauer et al., 2012), and rice protein concentrate (Oujifard et al., 2012).

Likewise, some papers have been published studying several alternative ingredients in other shrimp species, soybean (Piedad-Pascual et al., 1990, Paripatananont et al., 2001; Rahman et al., 2010), fisheries by-products (Sudaryono et al., 1995), lupine meal (Sudaryono et al., 1999a,b,c; Sudaryono, 2003, 2004; Smith et al., 2007a, b), pea and canola (Cruz-Suárez et al., 2001; Bautista-Teruel et al., 2003), canola (Bulbul et al., 2012), and a mixture of soybean, corn gluten and rapeseed (Richard et al., 2011), sunflower (Syama-Dayal et al., 2011), or soybean and canola (Bulbul et al., 2013).

In this search, legumes/pulses have been used as the main source of vegetable protein, and soybean meal has been widely studied and used in commercial fish and shrimp feeds, obtaining inclusions up to 100% in *Penaeus monodon* with soybean meal supplemented by shrimp meal (Piedad-Pascual et al., 1990), and recently in *L. vannamei* by a plant mixture including soybean, millo and pea (Sookying and Davis, 2011) and a mixture of soy protein concentrate and microbial floc meal (Bauer et al., 2012). However, soybean meal has the added disadvantage of high price due to its high demand for human food and animal

feeds. There is therefore a need to explore another source of plant protein for aquatic feeds.

Among non-traditional sources used in feeds for aquaculture, several authors agree that the profile of lupine meal, with its high protein content and balanced levels of amino acids, makes it a potential candidate to reduce the dependence of fish and soybean meals. The pearl or Andean lupine (*L. mutabilis* Sweet) is a legume cultivated in Ecuador and other South American countries such as Argentina, Chile and Peru, potentially making it an excellent ingredient for aquafeeds. Previous studies of fish such as rodaballo, *Psetta maxima* (Burel et al., 2000), gilthead sea bream, *Sparus aurata* (Pereira and Oliva-Teles, 2004) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (De la Higuera et al., 1988; Borquez et al., 2011) have shown that partial replacement of fishmeal by lupin and partial or total substitution of soybean is possible in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (Chien and Chiu, 2003). Likewise, in the shrimp *P. monodon*, a partial substitution of fish meal (Sudaryono et al., 1999a) or soybean meal (Sudaryono et al., 1999c) has been obtained with lupine meal.

These studies have allowed the development of low cost feed through partial or total replacement of fish meal without diminished growth, survival rates of animals nor feed efficiency. However, most of these studies have been carried out in aquarium or small plastic tanks, or production systems in which the natural productivity of the pond is not included, thus ignoring a resource that can generate a reduction in the production costs and a complementation of nutrients that could be covered up by the pond productivity. Nevertheless, some of experiments have been made in ponds (Amaya et al., 2007a; Soaking and Davis, 2011) where shrimp can feed on macro invertebrates reducing feed conversion ratio and masking the effect of diet.

The present work was designed to assess the potential of the pearl or Andean lupin (*L. mutabilis* Sweet) as a source of plant protein in practical feeds for shrimp *L. vannamei* in laboratory aquaria and cages in earthen pond.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Diet formulation and preparation

*L. mutabilis* Sweet seeds (INIAP 450 Andino variety) were soaked in tap water for 48 hours. Soaked grains were then cooked in boiling water for 40 minutes to remove the alkaloid. These were then drained, washed in tap water and soaked in running sea water for 4 days.

Lupin seeds were also subjected to a dehulling process in order to reduce fiber content. They were then dried in a fan-ventilated oven at 40 °C overnight. Oil was extracted by seven consecutive diethyl ether washings (2:1) under shaking at 135 rpm for 3 hours at a time, followed by removal of solvent by discarding. Subsequent grinding produced lupin meal. The nutritional composition of the lupin recorded before and after processing (Table 1) was analyzed by AOAC (1990).

**Table 1. Nutrient composition (%dry weight) of *Lupinus mutabilis* Sweet**

Parameter (%)	Whole seed meal	Dehulled and deoiled lupin meal (Kernel meal)
Moisture	5.73	10.30
Crude protein	50.51	61.45
Carbohydrate <sup>a</sup>	14.10	24.44
Crude lipid	28.22	1.24
Ash	1.44	2.57

<sup>a</sup> Calculated value: Carbohydrate=100-(ash+crude protein+moisture+crude lipid).

Experimental diets providing 35% protein and 11% lipid (Table 2) were prepared, where 0, 25, 50, 75 and 100% of fish meal protein (FM) was substituted by lupin kernel meal (LKM) on a protein basis. All diets contained 10% squid meal as an attractant. Only the corn starch (31.0 to 36.4%) and fish oil (5.3 to 7.1%) contents of the diets were varied to keep the protein and lipid content of the diets constant across treatments.



**Table 2. Ingredients and proximate composition of the diets**

<b>Ingredients</b>	<b>LKM0</b>	<b>LKM25</b>	<b>LKM50</b>	<b>LKM75</b>	<b>LKM100</b>
Fish meal <sup>1</sup>	32.91	24.68	16.46	8.23	0.00
Lupin meal <sup>2</sup>	0.00	9.12	18.25	27.37	36.50
Corn starch <sup>3</sup>	36.44	35.12	33.75	32.40	31.05
Fish oil	5.28	5.71	6.17	6.63	7.08
Squid meal <sup>4</sup>	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Wheat gluten <sup>5</sup>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Lecithin liquid	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cholesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamins premix <sup>6</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Minerals premix <sup>7</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Antioxidant	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Mold inhibitor	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Carboxymethyl cellulose	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Astaxantine	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chromic oxide	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
<b>Proximate composition (%dry matter)</b>					
Moisture (as was at mixing)	8.44	8.13	8.13	9.52	6.01
Crude protein (Nx6.25)	35.21	35.79	36.85	36.92	37.64
Crude lipid	11.23	12.07	11.08	11.51	10.70
Carbohydrate <sup>8</sup>	39.29	35.20	36.20	35.18	36.02
Ash	5.83	8.81	7.74	6.87	9.63
Energy (kJ g <sup>-1</sup> dry matter) <sup>9</sup>	17.9	17.7	17.8	17.8	17.8

<sup>1</sup>Produced by steam dry method (69.7% crude protein c.p.; 6.9% fat). Polar, Salango, Ecuador.

<sup>2</sup>Dehulled lupin meal, solvent extracted (66.4% c.p.; 1.2% fat)

<sup>3</sup>Purchase from Sumesa S.A., Guayaquil, Ecuador

<sup>4</sup>Processed in the laboratory by liophilized from commercial frozen baby squid *Loligo* sp (80.4% c.p.; 4.3% lipid)

<sup>5</sup>Purchase from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA

<sup>6</sup>(mg 100g<sup>-1</sup> diet): p-aminobenzoic acid, 10; thiamin-HCl, 12; riboflavin, 20; pyridoxine-HCl, 12; choline chloride, 250; nicotinic acid, 75; calcium pantothenate, 50; inositol, 200; biotin, 0.5; folic acid, 1.5; ascorbic acid, 10; menadione, 4;  $\alpha$ -tocopherol acetate, 40; cyanocolabamine, 0.03; cholecalciferol, 0.03;  $\beta$ -carotene,  $1.15 \cdot 10^{-3}$ .

<sup>7</sup>(mg 100g<sup>-1</sup> diet): calcium phosphate monobasic, 272; calcium lactate, 640.2; ferric citrate, 60; magnesium sulphate heptahydrate, 274; potassium phosphate, 480; sodium phosphate monobasic, 174; sodium chloride, 86; aluminium chloride, 0.4; potassium iodide, 0.3; cuprous chloride, 0.2; manganous sulfate monohydrate, 1.6; cobalt chloride hexahydrate, 2.1; zinc sulphate heptahydrate, 7.1; sodium selenite, 2.

<sup>8</sup>Calculated value: carbohydrate=total-(ash+crude protein+moisture+total lipid).

<sup>9</sup>Total calories was calculated using following factors: 23 kJ g<sup>-1</sup> protein; 35 kJ g<sup>-1</sup> lipid; 15 kJ g<sup>-1</sup> carbohydrate

Proximate analysis of the diets showed levels which closely mirrored the calculated values (Table 2), with the actual crude protein content ranging from 35.79% to 37.64% and lipid from 10.70% to 12.07%. The amino acid content of the experimental diets is presented in Table 3.

**Table 3. Amino acid profile of the experimental diets (g AA/16g Nitrogen)**

	LKM 0	LKM 25	LKM 50	LKM 75	LKM 100
Arginine	5.4	5.3	5.6	6.3	6.6
Histidine	2.5	2.0	1.9	2.0	1.8
Isoleucine	4.0	3.6	3.5	3.7	3.4
Leucine	7.3	6.7	6.4	6.5	6.1
Lysine	5.4	4.4	4.0	3.9	3.6
Methionine	2.5	1.9	1.6	1.2	0.8
Phenylalanine	3.9	3.4	3.2	3.3	3.1
Threonine	3.9	3.5	3.1	3.2	2.8
Valine	4.6	3.4	3.7	3.7	3.3
Sum of analyzed EAA	39.5	34.2	33.0	33.8	31.5
Alanine	7.1	6.6	5.6	4.9	3.8
Aspartic acid	9.0	8.8	8.3	9.0	8.2
Cystine	1.8	1.2	0.9	0.7	0.2
Glutamic acid	19.2	21.0	21.7	24.7	23.4
Glycine	6.9	6.3	5.3	5.0	3.9
Proline	4.9	5.3	3.6	3.7	3.7
Serine	3.8	3.8	3.8	4.1	3.8
Tyrosine	3.0	2.7	2.5	2.6	2.4
Sum of analyzed AA	95.2	89.9	84.7	88.5	80.9

Once all of the dry ingredients were mixed by hand, soy lecithin and fish oil were added. Finally, water was gradually added (400-500 ml/kg) until the resulting dough could be easily extruded. The moist mixture was pelleted in a 2-mm diameter meat mincer. The 5-10-cm long “spaghetti-like” strands were dried in a fan-ventilated oven at 60 °C for 2h. After drying, strands were broken up

into pellets of about 1 cm in length, packed in sealed plastic bags and then stored at -10 °C until use.

## 2.2. Palatability of diets

During the sixth and seventh week, shrimps were fed *ad libitum* at 08:00 h and 16:00 h with the experimental diets. In order to estimate the acceptability based on the ingestion rate over 13 consecutive days, the uneaten feed was collected two hours after each feeding by siphoning out through a previously weighted 300-µm mesh size net, dried at 60 °C for 24 h and then weighted to estimate the percentage of feed consumption according to biomass in each aquarium. A factor “F” was introduced to correct for feed losses due to water movement, aeration, siphoning and rinsing during the time that the feed was in the water. In order to determine this factor 10 aquaria with pellets but no shrimp were used. The amount of feed consumed by shrimp was expressed as a percentage of the biomass of shrimp in the aquaria and used as an indicator of diet palatability using the expressions:

$$\text{Palatability} = \frac{\text{Supplied feed} - (\text{Non consumed} \times F)}{\text{Biomass in aquarium}} \times 100$$

$$\text{Correction Factor (F)} = \frac{\text{Supplied feed}}{\text{Retrieved feed}}$$

## 2.3. Pellet water stability

The pellet water stability (PWS) was determined by a horizontal shaking method using an EYELA heated circulating water bath with shaker, Model NTS-120 (Japan). The shaker tray held up to six 200-ml flasks for each test run. Each flask was filled with 100ml seawater (35 g L<sup>-1</sup>) and 2g of feed. The shaker speed was adjusted to 70 rpm and water temperature to 28 °C. After 2 h of continuous immersion, the pellets were recovered using a filtration apparatus with a 1-mm metallic mesh. The pellets were dried in a convection oven at 60 °C for 24h and then cooled in a desiccator. The stability of the diets was expressed as the percentage of dry matter remaining of triplicates of pelleted the feed.

$$PWS = 100 - \left( W_{\text{dry before immersion}} - W_{\text{dry after immersion}} \right) \times 100$$

## 2.4. Digestibility assay

Seven days before the end of the growth trial, the shrimp were fed on their assigned diets that had been supplemented with 0.5% chromic oxide in order to acclimatize them to the new feed. The supplied feeds were left in the water for an hour and then uneaten feed and faeces were removed. Collection of the faecal material was performed 2h after feeding by siphoning. Faeces from the same aquarium were collected every day at 10:00 and 16:00 h and pooled in 30 individual Eppendorf tubes. The faeces were rinsed in distilled water to remove any salt and kept in an ice bath until the end of the day. They were then centrifuged for 5 min at 13000 rpm in a refrigerated centrifuge at 4 °C to decant and discard excess water. Thirty pools of 10 days worth of faeces were frozen in Eppendorf tubes at -80 °C. The faeces were then dried for 48h in a freeze drier. The dried faeces were ground to a fine and homogeneous powder in Eppendorf tubes with a metallic piston. Afterwards the faeces powder was oven dried for 24h at 60 °C and kept in a dry atmosphere using silica gel to ensure complete dryness at the time of weighing. Protein and chromic oxide were analyzed in the faeces and the six replicate diets following the procedure described by Foster and Gabbot (1971) and McGinnis and Kasting (1964), respectively.

The apparent digestibility (AD) of the test diets was calculated using the formula:

$$AD = 1 - \frac{(\% \text{ nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3) \text{ faeces}}{(\% \text{ nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3) \text{ diets}} \times 100$$

## 2.5. Growth trial in the laboratory

Juveniles of less than 0.3 g/shrimp, free of white spot syndrome virus (WSSV), were obtained from the experimental facilities of the National Aquaculture and Marine Research Centre (CENAIM). These juveniles were reared in a system with a high sea water exchange rate of 1000% day<sup>-1</sup>. The dissolved oxygen, salinity, and temperature averaged 5.1 mg L<sup>-1</sup>, 34.7 g L<sup>-1</sup>, and 28.1 °C,

respectively. Prior to initiating the experiment, juvenile shrimp were only fed crumbled feed (40% crude protein; 10% lipid) until the average shrimp weighed 1g.

Under laboratory conditions, juvenile *L. vannamei* with a mean body weight of  $1.23 \pm 0.18$ g (mean  $\pm$  SD), were randomly distributed with 8 shrimp ( $44 \text{ m}^{-2}$ ) in each 50-L 30 polyethylene aquaria (60x30x36 cm), each of which was supplied with aerated seawater.

Six replicate aquaria were assigned to each treatment in a fully randomized design and covered with 2 mm of mesh netting to prevent the shrimps from escaping. During the first two days, dead shrimp were replaced with shrimp of a similar weight. The experiment used a flow-through system. Seawater entering the aquaria was filtered through a sand filter and a 20- $\mu\text{m}$  cartridge and exchanged at a rate of 1000% per day. A handheld oxygen meter WTW OXY3150i (Weilheim, Germany) was used to monitor the temperature and dissolved oxygen concentration twice a week and a refractometer was used to track salinity. Over the experimental period, the average temperature, dissolved oxygen and salinity were  $27.3 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $25.3\text{-}29.3^\circ\text{C}$ ),  $5.83 \text{ mg L}^{-1}$  ( $3.19\text{-}7.00 \text{ mg L}^{-1}$ ) and  $35 \text{ g L}^{-1}$  ( $35\text{-}36 \text{ g L}^{-1}$ ), respectively. Light was provided by daylight fluorescent tubes (General Electric 40 W, USA). Light intensity was measured by a photometer Type 3281 (Yokogawa, Japan) at the water surface. Water depth was 30 cm in the experimental aquaria. The daylight had an intensity of  $1427 \pm 103 \text{ lx}$ . Photoperiod was 12 h light:12 h dark. Light was switched on at 09:00 h and off at 21:00 h.

The shrimps were fed *ad libitum* four times a day (08:00, 12:00, 16:00 and 20:00 h) during the first five weeks and then reduced to twice a day (08:00 and 16:00h) for three weeks. Uneaten feed and faeces were siphoned out every morning before the first feeding while moults were discarded throughout the day. Every 15 days the aquaria were thoroughly cleaned and the shrimps were weighed and counted in order to determine weight gain and survival rate, respectively.

## 2.6. Growth trial in the field

In order to confirm the results obtained in the laboratory bioassay and determine the contribution of natural productivity and experimental feeds to the overall nutritional budget of *shrimp*, an experiment under commercial conditions was carried out. The growth trial was conducted in bottomless cages (1 m<sup>2</sup> surface and 1.50 m height) sited in a single 1000-m<sup>2</sup> pond greenhouse. The cages were made with polyethylene mesh (15 x 20 mm aperture) and they were buried approximately 20 cm and spaced 40 cm apart. Following the density currently used in the farm, 30 juvenile shrimps *L. vannamei* were installed in each cage. The feed was offered on a tray at 6.5% (5.5 to 9 g), 6% (9 to 11.5g) and 5.5% (11.6 g to harvest) of the biomass twice a day for 45 days. Five replicates were performed for each treatment. Additionally, five cages with shrimp, but without feed supply (NF), were placed in the pond. The five diets and the unfed control, as well as the animals, were randomly allocated to the 30 cages.

There was no water exchange, however, the loss of water through seepage and evaporation was recovered. Abiotic parameters such as dissolved oxygen concentration (8.7±3 mg L<sup>-1</sup>) and temperature (33±1 °C) in the water were monitored daily at 06:00 h. Light intensity inside the greenhouse, measured by a light meter lux/fc (Model 840022, Sper Scientific Ltda., USA) every day during the experimental period, was 25474.9±19287 lx. The cages were sampled on a weekly basis to estimate mean weight and adjust the amount of feed. At the end of the experimental period all the shrimps were counted and weighed to estimate the feed conversion ratio, survival, biomass gained and final mean weight.

## 2.7. Performance parameters

The growth parameter used to evaluate the quality of diets was calculated by the following equation:

$$\text{Specific growth rate (SGR; \% day}^{-1}\text{): } SGR = \left[ \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t(\text{days})} \right] \times 100$$

Daily feed intake (DFI, % d<sup>-1</sup>) was calculated using the expression:

$$DFI = \left[ \frac{\text{Supplied feed}}{\text{Average Biomass}} \times 100 \right] / t(\text{days})$$

The feed conversion ratio (FCR) was estimated using the formula presented by Brand and Colvin (1977) for correcting dead shrimps:

$$FCR = \frac{\text{Total feed supplied}}{B_f + \left[ \sum \frac{W_i + W_f}{2} \times N \right] - B_i}$$

Where B<sub>f</sub> = final biomass, B<sub>i</sub> = initial biomass, W<sub>i</sub> = average initial weight in each period, W<sub>f</sub> = average final weight in each period, N = number of dead shrimp in each period.

An estimation of the percentage of Contribution of Natural Productivity (CNP) to nutritional requirements was made using the following equation:

$$CNP = 100 - [(W_f - W_i) \text{ unfed shrimp} / (W_f - W_i) \text{ fed shrimp}] * 100$$

## 2.8. Analytical methods

The feed ingredients and diets were milled to fine powder (300 µm) and their proximate compositions were analyzed using standard laboratory procedures (AOAC, 1990). Dry matter was calculated from weight loss after drying in an oven at 105 °C for 2 h. Crude protein (%Nx6.25) was measured using Kjeldahl method after acid digestion. Crude fat was calculated after extraction with diethyl ether extraction (Soxhlet technique). Ash was determined after ignition of the samples at 550 °C for 4 h in a muffle furnace. Amino acids were determined by high-performance liquid chromatography (Shimadzu, Japan) after hydrolysis of samples in 6 N HCl for 24 h at 110 °C. Then, samples were derivatized with o-phthaldialdehyde (OPA) according to Antoine et al. (1999).

## 2.9. Statistical analysis

The Anderson-Darling test was used to check for normality. Bartlett's test for homogeneity of variance was employed with P=0.05 (Zar, 1999). All the data

was subjected to the one-way analysis of variance (ANOVA) test ( $P < 0.05$ ), considering initial weight as covariate. Where ANOVA revealed significant differences, Student-Newman-Keul's multiple comparison test at  $P < 0.05$  was applied to characterize and quantify the differences between treatments using Statgraphics (Statistical Graphics System, Version Centurion, Herndon, VA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Stability and palatability of experimental diet

Pellet water stability was positively related ( $P < 0.05$ ) to the level of dietary LKM (Table 4). The diet with the highest lupine inclusion level, LKM100, was the most stable ( $P < 0.05$ ) after 2 h of immersion at 95 %, and the diet without lupine, LKM0, presented the lowest value, at 82%. The rest of the diets had intermediate values of stability, between 85 and 90%.

**Table 4. Pellet water stability (PWS) and palatability of diets containing different replacements levels of fishmeal by lupin**

DIET	LKM 0	LKM 25	LKM 50	LKM 75	LKM 100	SEM
<b>Pellet water stability (%)</b>	82.2 a	85.5 b	86.7 b	90.3 c	95.2 d	0.84
<b>Palatability (% d<sup>-1</sup>)</b>	8.40 a	7.15 b	4.47 c	3.37 d	3.47 d	0.27

Mean of three replicates for PWS and thirteen replicates for Palatability.

SEM = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

The palatability results in the laboratory trial revealed a better acceptance of the LKM0 diet (8.4% d<sup>-1</sup>) compared with the rest of the test diets. Feed intake for diets LKM75 and LKM100 were by far ( $P < 0.05$ ) the lowest among all the other diets (3.4% d<sup>-1</sup>).

#### 3.2. Digestibility

The apparent dry matter digestibility (ADMD) decreased from 78.5 to 66.5% with the increase of LKM in the diet. The three highest replacement diets (50,



75 and 100%) had significantly ( $P<0.05$ ) lower ADMD than the two lowest replacement diets (0 and 25%) (Table 5). The apparent protein digestibility (APD) did not differ ( $P>0.05$ ) among the diets with 25, 50, 75, and 100% replacement, but was significantly ( $P<0.05$ ) lower with 0% replacement (control diet).

**Table 5. Apparent dry matter (ADMD) and protein (APD) digestibility of diets containing different replacements levels of fishmeal by lupin**

DIET	LKM 0	LKM 25	LKM 50	LKM 75	LKM 100	SEM
<b>ADMD (%)</b>	78.5 a	72.7 b	67.7 c	66.0 c	66.5 c	1.48
<b>APD (%)</b>	80.5 a	77.6 b	75.5 b	76.8 b	76.0 b	1.01

Mean of six replicates.

SME = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ )

### 3.3. Survival, growth, and feed performance

The parameters for survival, growth, and feed performance for the aquaria experiment are shown in Table 6. No difference in initial individual weight using ANOVA indicated that the shrimp were homogeneously distributed between the treatments and replicates at stocking. There were no differences in survival, but there were statistical differences in SGR, DFI and FCR between the treatments. Shrimp fed diets LKM0, LKM25 and LKM50 (0, 25 and 50% replacement levels) exhibited similar results for SGR and FCR, with higher values than those fed on diets LKM75 and LKM100. In terms of daily feeding intake, this was highest for diet LKM0 and lowest for diet LKM100.

At the end of the cage experiment in the field, no significant differences ( $P>0.05$ ) in final weight, SGR, survival, DFI and FCR were found between any of the experimental shrimp diets (Table 7). In contrast, the control cages without feed supply presented a lower growth and survival rate than the average of the fed cages ( $P<0.05$ ).

**Table 6. Growth performance of white shrimp, *L. vannamei* reared for 57 days in 50-L indoor (clear water) aquaria and fed the different experimental diets.**

DIET	LKM 0	LKM 25	LKM 50	LKM 75	LKM 100	SEM
Initial weight (g/shrimp)	1.19	1.18	1.24	1.20	1.27	0.06
Final weight (g/shrimp)	7.02 a	6.68 a	6.70 a	5.22 b	4.76 b	0.31
SGR (% day <sup>-1</sup> )	3.05 a	3.00 a	2.99 a	2.52 b	2.42 b	0.09
Survival (%)	82.3	81.8	96.8	90.4	86.1	5.68
DFI (%BW day <sup>-1</sup> )	6.48 a	5.31 b	5.99 ab	4.87 b	3.51 c	0.32
FCR	2.71 a	2.17 a	2.48 a	2.24 a	1.66 b	0.15

Mean of six replicates using initial weight as covariate

SME = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

The estimation of percentage contribution of natural productivity to the nutritional requirements of juvenile shrimp fed on different experimental diets varied between 26 and 31% and there were no statistical differences between them ( $P > 0.05$ ) (Table 7).

**Table 7. Growth and nutritive performance of *Litopenaeus vannamei* reared for 45 days in 1-m<sup>2</sup> bottomless cages and fed diets containing different levels of lupin meal (LKM) in replacement of fish meal.**

DIET	LKM 0	LKM 25	LKM 50	LKM 75	LKM 100	SEM
Initial weight (g/shrimp)	5.87	5.98	5.63	5.85	5.79	0.11
Final weight (g/shrimp)	11.67	11.68	11.89	11.06	12.21	0.49
SGR (% day <sup>-1</sup> )	1.53	1.54	1.57	1.43	1.63	0.09
Survival (%)	77.1	80.4	70.8	78.6	69.2	5.1
DFI (%BW day <sup>-1</sup> )	2.87	2.73	3.12	2.90	2.77	0.17
FCR	2.17	1.99	2.35	2.32	2.04	0.20
Harvest biomass (g m <sup>-2</sup> )	268	281	250	261	249	12.6
CNP (%)	31.0	31.3	37.0	25.9	37.8	5.7

Mean of five replicates using initial weight as covariate

SME = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

## 4. Discussion

### 4.1. Diet composition and water stability

In the present study, *L. mutabilis* had a whole seed protein content of about 50% DM and a dehulled and deoiled lupin kernel protein content of 61% DM, both higher than that reported for other species. Glencross (2001) reported that, depending on the species, the protein content of dehulled lupin seeds (up to 57% DM) was higher than that of whole ones (44-45% DM). Like other lupin species and most legumes *L. mutabilis* protein contains low amounts of lysine and the sulfur amino acids, methionine and cystine, but has more arginine than soybean and a reasonably good balance of essential amino acids (Glencross, 2001). Nevertheless, as FM was replaced by increasing levels of LKM in the diets, there was a resulting increase in arginine and decrease in both lysine and methionine. When compared with published amino acid recommendations for juvenile *L. vannamei* (Akiyama et al., 1992), we found that threonine in three of diets (LKM50, LKM75, LKM100), methionine, lysine, phenylalanine and valine in all diets (except LKM0), and histidine in a 100% replacement diet were apparently deficient (Table 3). The other three amino acids exceeded the requirements in all the diets.

The lipid content of *L. albus* (7.6-11.8%), *L. angustifolius* (4.9-7.0%) and *L. luteus* (5.2-6.1%) reported by Sudaryono et al. (1999b) or Glencross (2001) were lower than *L. mutabilis* reported in this study (28%). Then, it was necessary to reduce this level in order to formulate diets with an adequate level of fish oil.

The water stability of experimental feeds was linked to the dietary level of LKM, with the percentage of dry matter remaining after 2 h immersion in seawater increasing significantly with increasing levels of LKM in the diets. Removing the seed coat to produce a kernel alters the composition of the resulting kernel meal, by decreasing the fiber content (Schoeneberger et al., 1982) contributing to a more binding diet. It is known that fiber levels affects water stability of diets, Akiyama et al. (1992) reported that feeds with high levels of fiber had reduced water stability which corroborates the work of Sudaryono et al. (1999b) who

found that diets containing 40% whole lupin (*L. albus*) seed meal with 6.3% fiber, exhibited a lower percentage of retained dry matter than diets with 35% dehulled lupin containing 4.1% fiber. Nevertheless, Sudaryono et al. (1999a) reported a decrease in water stability in diets as a result of increased dietary levels of dehulled lupin seed meal and an increase in levels of fiber, but these results do not corroborate those obtained in the present trial. The differences in water stability between the Sudaryono et al. (1999a, 2001) study and the present work are most likely to have been caused by the different carbohydrate content of the diets. A decrease in the amount of mainly starch sources (wheat flour: 18.5% to 9% and rice bran: 9% to 1%) in addition to an increase in the level of LKM of 10% (0-40%) may be responsible for the decreased water stability found in the former study. In contrast, the diets in the current study were formulated using corn starch as a filler (30-36%) and with an increasing level of lupin of 9% (0-36.5%). This could have improved the extrusion process, as Glencross et al. (2010) claimed that the inclusion of LKM increased the rate and degree of gelatinization, bulk density and pellet hardness of the mash starch content. The higher levels of water stability observed in the present study may be also attributed to the solvent used for fat extraction in the LKM affecting the properties of the lupin meal. The solvent, diethyl ether, used for fat extraction in the LKM, markedly affects functionality by removing non-polar lipids such as triglycerides and excluding polar lipids such as fatty acids and phospholipids. Sudaryono et al. (1999b) also reported that the highest percentage of remaining dry matter was for lupin protein concentrate as opposed to whole or dehulled lupin (*L. albus* and *L. augustifolius*) seed meal, which may explain why the pellet water stability was significantly affected by the inclusion of dehulled and defatted lupin seed meal in the diets used in the present study. Protein losses were similar for all diets, Sudaryono (2001).

#### **4.2. Digestibility**

The ADMD results indicate that the lupin seed-based diets are not as well digested by juvenile *L. vannamei* as diets with no LKM. Sudaryono et al. (1996) reported that a low ADMD was found in diets of juvenile *P. monodon* containing 70% lupin meal made from the whole *Lupin\_spp.* seed, but Sudaryono et al. (1999a,c) observed that diets containing up to 40% dietary dehulled *L. albus*

seed meal can be efficiently digested by *P. monodon*. These findings do not corroborate those of the present trial where dietary lupin levels ranged between 9 and 36%.

A significant decrease in apparent digestibility of dietary protein was observed when fish meal was replaced by any increment of LKM when compared to the control diet (80.5%). The APD values ranged from 75.5 to 77.6% in diets containing 9-36% LKM with no differences between the diets, and the values were lower than those of Sudaryono et al. (1996, 1999a). In juvenile *P. monodon*, however, APD gradually increased from 89.6% to 93.1% and was positively linked to lupin meal levels (Sudaryono et al., 1999a). When both dehulled and whole lupin seed meals were fed to *P. monodon*, it was found that the apparent digestibility of dry matter and crude protein of the dehulled lupin seed meal was higher than that of whole ones (Sudaryono et al., 1999b). These improvements are attributed to a reduction in indigestible insoluble non-starch polysaccharides (NSP, i.e. cellulose, hemicellulose, and lignins), which are composed of a soluble and an insoluble carbohydrate fraction (Sinha et al., 2011), and are primarily found in the seed coat. In the present study the lupin seed was dehulled before making meal and therefore the reduction of digestibility cannot be attributed to the NSP present in the seed coat. In lupins, the soluble NSP are predominantly oligosaccharides composed generally of  $\alpha$ -galactosyl homologues of sucrose and ranging from 70 to 120 g kg<sup>-1</sup> dry matter (Trugo and Almeida, 1988). At high concentrations, they could be considered anti-nutritional components for some species. In both *L. angustifolius* and *L. albus*, the ethanol extraction process notably removes soluble carbohydrate fractions comprised in a large proportion of oligosaccharides (70%) (Coon et al., 1990) and has also been reported to improve the nutritional value of lupins for trout. Glencross et al. (2003), when examining the influence of the oligosaccharide in *L. angustifolius* seed meal when fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, demonstrated that oligosaccharide had a negative effect on the digestibility of the nutrients and energy of the diets evaluated. The removal of the ethanol-soluble component of the lupin meal had the greatest influence on the apparent digestibility of the energy, nitrogen, organic matter and nitrogen-free extractive components. NSP fractions can be detrimental to

digestion because they alter gastric emptying, rate of passage, gut physiology and morphology, the native gut microflora and gut mucus layer, obstructing the digestive enzyme activity by changing digesta viscosity (Sinha et al., 2011). Although NSP was not determined in this study, the anti-nutritive potential of NSP could have an effect on *L. vannamei* because the dehulled LKM treatments had lower ADMD and APD than the control without LKM. This supports the hypothesis that oligosaccharides can interfere with digestion of other nutrients when fed to *L. vannamei*, and suggests that the oligosaccharide content of *L. mutabilis* may also be influencing the nutritional value of its own protein.

### **4.3. Growth and feed performance**

The body weight gain in the shrimp reared in aquaria followed the trend of feed intake and decreased gradually with the increase in concentration of LKM in the feed. In the present study, *L. vannamei* displayed good growth with a 50% substitution of fish meal by de-fatted and dehulled *L. mutabilis* seed, but a significant decrease in weight gain and SGR when levels of 75% and above of the dietary fishmeal was replaced with lupin, meaning that 45% of the total dietary protein was from the LKM (27.4% inclusion level). This corroborates the findings of Sudaryono et al. (1999a) who found negative effects on the growth of juvenile *P. monodon* when dietary fishmeal was replaced totally by dehulled *L. albus* seed - an equivalent of 42% of the total dietary protein.

Better results with white shrimp growth were obtained when fish meal was substituted by several alternative sources; 80% fish meal by a co-extruded mixture of soybean and poultry meal (Davis and Arnold, 2000), 100% fish meal by mixtures of soybean and poultry meal (Samocha et al., 2004; Amaya et al., 2007b), 100% fish meal by a mixture of soybean and canola (Suarez et al., 2009), 50% fish meal by rice protein concentrate (Oujifard et al., 2012), 100% fish meal by soy protein concentrate (Sá et al., 2012), 100% fish meal by a mixture of soy bean meal and microbial floc meal (Bauer et al., 2012), 50% fish meal by a mixture of soy bean meal and animal meats (Ye et al., 2012). In general, it seems that mixtures of vegetable sources with animal meals give the best results.

The reductions in growth observed in experiments where fish meal was replaced by alternative protein sources have been attributed to anti-nutritive factors and an inadequate balance of amino acids and minerals in the tested sources (Lim and Dominy, 1991). Methionine and lysine are probably the most limiting and least-cost effective of the commercial feed formulae. The methionine level observed in 25%, 50%, 75% and 100% replacement diets is below the recommended level for shrimp diets (2.4% of protein) by Akiyama et al. (1992). The low level of methionine in lupin protein did not appear to limit the nutritional value of the feed when the dietary lupin inclusion level was 18.25% (LKM50), equivalent to about 32% of the total dietary protein. Despite the lower methionine level (1.6% of protein) in LKM50 diet, the average weight gain and SGR were not significantly different from those of the control diet. This can be attributed in part to the sparing effects of cysteine. Despite the fact that cysteine cannot be converted into methionine, the presence of cysteine lowered the use of methionine for protein synthesis and lessened the requirement for methionine (Moon and Gatlin, 1991; Goff and Gatlin, 2004). On the other hand, another reason may be that the amount of methionine recommended for shrimp feed by Akiyama et al. (1992) is overestimated, as Fox et al. (2006, 2011) suggested. The latter authors found that when feeding 35% crude dietary protein to *L. vannamei* shrimp the apparent methionine requirement was in fact 0.40% of the diet, equivalent to 1.14% protein; a lower amount than that reported (2.4%) by Akiyama et al. (1992). Likewise, Bauer et al. (2102) have reported optimum growth in white shrimp which have been fed diets containing lower dietary methionine levels than the requirements. From these results, it appears that the current dietary methionine recommendation is much higher than the actual requirement, when the diets contain 35% crude protein. This is clearly an issue that needs to be resolved.

According to Fox et al. (1995), the lysine level in 25%, 50%, 75% and 100% replacement experimental diets did not meet the requirements of *L. vannamei* (4.5% of dietary protein). Although diets LKM25 and LKM50 contained levels of lysine slightly below the requirement (4.4 and 4.0% of protein, respectively), the shrimps fed on these two diets did not show any significant difference ( $P>0.05$ ) in growth when compared to the control. Nevertheless, the growth of the

animals fed on diets LKM75 and LKM100 was significantly lower than that of LKM0, LKM25 and LKM50. Recently, Xie et al. (2012) have re-evaluated the lysine requirements of *L. vannamei*, and the needs are higher (4.93% DP) than those suggested by Fox et al. (1995), meaning that the experimental LKM25 diet should clearly be deficient.

It is reasonable to assume that a replacement of 75 and 100% FM with LKM under isonitrogenous and isocaloric conditions would also have a negative effect on weight gain due to the deficiency of lysine, accentuated by the deficiency of methionine and the significantly lower levels of consumption of these two diets. The combination of low levels of methionine and lysine in lupin protein appears to limit the nutritional value of the feed when the dietary lupin inclusion level is equivalent to 45% of the dietary protein. Hence, the optimal supplementation of lysine and eventually other essential amino acids such as methionine must be considered in future studies with shrimp.

The present study shows that a replacement of HP in shrimp feed adversely affects feed intake, especially with diets LKM75 and LKM100. This response seems to be linked to a decrease in palatability of the feed when HP is replaced with LKM. Although alkaloids levels of  $>100 \text{ mg kg}^{-1}$  have been reported to cause palatability problems in rainbow trout diets (Serrano et al., 2008), there have been no reports of problems directly attributed to alkaloids in the diets of shrimp (Adler and Kittelson, 2004; Glencross, 2001; Smith et al., 2007b). The alkaloid levels of various cultivated lupin species range from 2.5-10% (Glencross, 2001; Petterson, 2000) and in the case of *L. mutabilis* the levels have usually been found to be  $>3\%$  (Peralta et al., 2009). Although, the solution used in this study to reduce the alkaloid level in the lupin seeds was aqueous extraction, it seems that this was not enough to avoid the bitter taste that alkaloids impart. Smith et al. (2007b) examined the influence of the alkaloid gramine when it was included in diets fed to black tiger shrimp, *P. monodon*, and found that inclusion levels of up to 900 mg/kg of gramine did not significantly affect the daily feed intake over a 6h period, probably due to slow feeding and rapid leaching of gramine from feed. It is possible that the difference in the response observed in the present study may have been influenced by the type alkaloid present in *L. mutabilis* or by the presence of



some kind of repellent compound and by the fact the amount of feed eaten was determined over a period of 2h. In every case, the intake of the experimental diets was clearly reduced by a high inclusion of LKM (27-36%), agreeing in part with Sudaryono et al. (1999a) who reported a smaller feed ingestion with a dehulled lupin meal inclusion of 30-40%. Saraç et al. (1998) obtained higher levels of inclusion of whole, dehulled and lupin meal concentrate without effects on intake, although the growth of tiger shrimp *P. monodon* was reduced.

Besides the poorer digestibility of diets LKM75 and LKM100 when compared to LKM25 and LKM50, and the lower essential amino acid balance in LKM75 and LKM100 than in the other diets (Table 3), the poorer growth seen in diets LKM75 and LKM100 than in LKM25 and LKM50 may also be attributed to lower levels of ingestion. Since these diets contained the same concentrations of protein, it is reasonable to accept that the growth rate under laboratory conditions was strongly related to feed intake, consequently resulting in a lower protein, methionine and lysine ingestion.

The variability of feed intake had an impact on the FCR values observed in this study with feed conversion values lower with LKM inclusions, but these results are not of any use, because growth was also much lower. Nevertheless, the FCR in the present trial were higher than those cited by some authors (Lim et al., 1997; Davis and Arnold, 2000; Samocha et al., 2004; Amaya et al., 2007b; Bauer et al., 2012; Ye et al., 2012), but similar to those reported by others (Davis et al., 2002; Molina-Poveda and Morales, 2004; Nunes et al. 2011).

No differences in mortality were found, and the main cause for the decrease in survival rate was the shrimp jumping out of the aquariums despite being covered with 2mm of mesh.

The growth experiments conducted in cages in earthen ponds showed that, unlike the study conducted in aquaria, the gradual increase of LKM in diets did not produce a significant decrease in shrimp growth even when all the FM in the experimental feed was replaced by LKM. This is because the bottomless cages allowed the shrimp free access to the substrate and the flora and fauna found there. This suggests that feeds with a lower biological value can be

enhanced through the simultaneous shrimp consumption of the natural productivity present in an earthen pond (Leber and Pruder, 1988; Moorthy and Altaff, 2002). Others studies have also found that natural food contributed significantly (77-83%) to shrimp growth (Lawrence and Houston, 1993), even when using vegetable ingredients such as rice and wheat bran and soybean meal without marine meals.

Piedad-Pascual et al. (1990) conducted a growth trial in 1-m<sup>2</sup> cages in a 1-ha earthen pond using *P. monodon* juveniles shrimps, and after 3 months, the shrimps fed on diets containing 55% soybean meal (with a total replacement of fish meal) reached the same final weight as those fed on 15% soybean meal and 30% fish meal. According to Moss et al. (1992) pond water can enhance juvenile shrimp growth by as much as 89% over the growth rates attained in clear well water. The growth enhancement has been attributed to the shrimp's consumption of the microalgae and microbial-detrital aggregates present in pond water (Moss and Pruder, 1995), which in addition to the exogenous enzymes (Moss et al., 2001), supplies essential compounds lacking in the shrimp's diet (Tacon et al., 2002) and enhances by unknown levels the resulting growth factors (Leber and Pruder, 1988), out competing pathogenic bacteria.

Recent trials in *L. vannamei* reared in ponds (Amaya et al., 2007a; Sookying and Davis, 2011) have shown the possibility of feeding white shrimp without fish meal with excellent conversion rates, even without dietary supplements of cholesterol. The requirements of this ingredient have been re-evaluated and reduced by Morris et al. (2011) and in fact some authors (Cruz-Suarez et al., 2007; Amaya et al., 2007b; Ye et al., 2011, 2012; Nunes et al., 2011; Sá et al., 2012) obtained goods results without any dietary cholesterol supplement, which would have an important effect on diet cost.

The natural productivity of ponds can be important in the feeding of shrimp. Although the unfed shrimp in bottomless cages grew, albeit less than fed shrimp (Table 8), survival was lower. Lawrence and Houston (1993) estimated a percentage contribution of natural productivity of 83% and 77% for *L. vannamei* stocked at 15 and 20 m<sup>-2</sup> respectively. The estimation of percentage contribution of natural productivity from the data obtained in this study indicates

that there was a nutritional demand of 26 to 31% for *L. vannamei* stocked at 30 m<sup>-2</sup>. These differences are mainly due to lower stocking densities and shorter experimental periods (28 d) compared to the present work. Conceptually, as the stocking densities and the harvested biomass increase in an earthen pond, the percentage contribution to the nutritional requirements of shrimp would decrease.

**Table 8. Comparison of growth performance of *Litopenaeus vannamei* reared for 45 days in 1-m<sup>2</sup> bottomless cages and fed experimental diets and fed natural productivity**

	DIET	DIET	NATURAL
Initial weight (g/shrimp)	5.82 ±0.05	5.82 ±0.05	5.92 ±0.11
Final weight (g/shrimp)	11.68 a ±0.23	11.68 a ±0.23	9.84 b ±0.52
SGR (% day <sup>-1</sup> )	1.53 a ±0.05	1.53 a ±0.05	1.13 b ±0.10
Survival (%)	75.5 a ±2.2	75.5 a ±2.2	56.2 b ±4.9
Harvest biomass (g/m <sup>2</sup> )	262 a ±5.3	262 a ±5.3	161 b ±11.9

Mean of twenty five replicates for diet and five for natural using initial weight as covariate  
Values in the same row with different superscripts are significantly different (P< 0.05)

Likewise, in recent laboratory experiments Moss et al. (2006) found that shrimp fed a 35%-protein diet minus vitamin premixes for 10 weeks in a flow-through shrimp pond water displayed a growth rate, 306% higher than those fed the same feed in flow-through well seawater. Shrimp in pond water with no feed additions survived and grew, indicating that shrimp derived some nutrition from web food.

Overall results have demonstrated that a low-cost feed made mostly from lupin meal as an alternative major protein source for imported fish meal and soybean meal can support production of *L. vannamei* stocked at 30 animals m<sup>-2</sup> in cages under seawater pond conditions for a period of 45 days. A similar result was reported by Sudaryono (2004) in *P. monodon* stocked at 10 animals m<sup>-2</sup> in

cages under brackishwater pond conditions for a period of 60 days. The differences between the findings observed in aquarium and cages could be attributed to the trials being carried out in ponds where the natural productivity may have supplemented any amino acid imbalance in the diets tested. Although no cost-benefit analysis of shrimp production was conducted in this study, the inclusion of LKM produces a reduction in diet price of 56, 113, 169 and 225 US\$ ton<sup>-1</sup> respectively for the 25, 50, 75 and 100 diets, meaning an increase in profit would be achieved by using diets LKM75 or LKM100 in real conditions of shrimp production.

## **5. Conclusion**

In summary, the experiments presented here reveal that feeds of varying levels of fish meal replacement perform significantly better in shrimp pond water than in clear seawater. Therefore and according to these findings, *L. mutabilis* Sweet could be a potential protein sources to replace fish meal in commercial feeds for the growth phase of *L. vannamei*. The study should be repeated under pond conditions to see whether a total replacement of FM by LKM also results in no alteration to growth performance or feed utilization when compared to the control diet.

## **Acknowledgements**

This work was partially funded by a grant from the International foundation for Science (A/330). The authors would like to extend their thanks to Dr. David Smith who contributed towards the outcome of this study and staff at CENAIM for their support during this study. The English version of the manuscript was revised by Anna Sinclair.

## **References**

Adler, L.S., Kittelson, P.M., 2004. Variation in *Lupinus arboreus* alkaloid profiles and relationships with multiple herbivores. *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 371-390

Akiyama, D. M., Dominy, W. G., Lawrence, A. L., 1992. Penaeid Shrimp Nutrition. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), Marine Shrimp Culture: principles and practices. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, USA, pp. 535-568.

Amaya, E.A., Davis, D.E., Rouse, D.B., 2007a. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* 262, 393-401.

Amaya, E.A., Davis, D.E., Rouse, D.B., 2007b. Alternative diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 262, 419-425.

Antoine, F.R., Wei, C.I., Littell, R.C., Marshall, M.R., 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 5100–5107.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1298pp.

Bautista-Teruel, M., Eusebio, P.S., Welsh, T.P., 2003. Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225, 121-131.

Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Borges, M., Wasielesky Jr., W., Poerch, L., 2012. Substitution of fishmeal with microbial flocculant meal and soy protein concentrate in diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 342-343, 112-116.

Borquez, A., Serrano, E., Dantagnan, P., Carrasco, J., Hernandez, A., 2011. Feeding high inclusion of whole grain white lupin (*Lupinus albus*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, nutrient digestibility, liver and intestine histology and muscle fatty acid composition. *Aquaculture Research* 42, 1-12.

Brand, C., Colvin, L., 1977. Compounded diets for early postlarval *Penaeus californiensis*. *Proceeding of the annual meeting - World Mariculture Society* 8, 811-820.

- Bulbul, M., Abdul Kader, Md., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., 2012. Effect of replacing fishmeal with canola meal on growth and nutrient utilization in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research* <http://dx.doi.org/10.1111/are.12026>.
- Bulbul, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Abdul Kader, Md. 2013. Performance of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* fed diets replacing fish meal with a combination of plant meals. *Aquaculture* 372-375, 45-51.
- Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S. J., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K. A., Kühn, E. R., Quinsac, A., Krouti, M., Ribaillet, D., 2000. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for rodaballo (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilization and thyroid status. *Aquaculture* 188, 363-382.
- Chien, Y.H., Chiu, Y.H., 2003. Replacement of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) meal by lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal in diet for juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared indoors. *Aquaculture Research* 34, 1261-1268.
- Coon, C.N., Leske, K.L., Akavanichan, O., Cheng, T.K., 1990. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fibre digestion in adult roosters. *Poultry Science* 69, 787– 793.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.A., Hickling D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196, 87-104.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 8, 87-94.
- Davis, A., Samocha, T.M., Bullis, R.A., Patnaik, S., Browdy, C., Stokes, A., Atwood, H., 2004. Practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): Working towards organic and/or all plant production diets. In: Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villareal, D., Scholz, U., González, M. 2004. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium*

Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora. México.

De la Higuera, M., Garcia-Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suarez, M.D., Moyano, F.J., 1988. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 71, 37–50.

Foster J.R., Gabbot P.A., 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 943-961.

Fox, J. M., Lawrence, A. L., Li-Chan, E., 1995. Dietary requirements for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* 131, 279-290.

Fox, J.M., Davis, D.A., Wilson, M., Lawrence, A.L., 2006. Current status of amino acid requirement research with marine penaeid shrimp. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-Lopez, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Puello-Cruz, A.C., Garcia-Ortega, A. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola*, Vol. VIII, pp. 182–196.

Fox, J. M., Humes, M., Davis, D.A., Lawrence, A., 2011. Evaluation of methionine supplements and their use in grain-based feeds for *Litopenaeus vannamei*. *Journal World Aquaculture Society* 42, 676-686.

Glencross, B. D., 2001. Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Grains Research Council (GRC) of WA Project “Assessment of the nutritional variability of W.A lupins as an aquaculture feed ingredient”. Department of Fisheries. Research Division. Government of Western Australia. Fisheries Western Australia. 126pp.

Glencross, B. D., Boujard, T., Kaushik, S. J., 2003. Influence of oligosaccharides on the digestibility of lupin meals when fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 219, 703–713.

Glencross, B.D., Hawkins, W., Maas, R., Karopoulos, M., Hauler, R., 2010. Evaluation of the influence of different species and cultivars of lupin kernel meal

on the extrusion process, pellet properties and viscosity parameters of salmonid feeds. *Aquaculture Nutrition* 16, 13–24.

Goff, J.B., Gatlin, D.M. III, 2004. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine. *Aquaculture* 241, 465–477.

Hanel, R., Broekman, D., de Graaf, S., Schnack, D., 2007. Partial replacement of fishmeal by liophylized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in Pacific white shrimp diets. *The Open Marine Biology Journal* 1, 1-5.

Harter, T., Buhrke, F., Kumar V., Focken, U., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2011. Substitution of fish meal by *Jatrofa curcas* kernel meal: Effects on growth performance and body composition of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition* 17, 542-548.

Ju, Z.Y., Forster, I.P., Dominy, W.G., 2009. Effect of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulate diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292, 237-234.

Lawrence, A.L., Houston, D .M., 1993. Nutritional response of juvenile *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* to different quality feeds in the presence and absence of natural productivity. Pages: 113-124. In: McVey, J.P., Collie, M. (Eds) *Proceedings 20th US-JAPAN Symposium on Aquaculture Nutrition*.

Leber, K.M., Pruder, G.D., 1988. Using Experimental Microcosms in Shrimp Reseach: The growth-enhancing effect shrimp pond water. *Journal of World Aquaculture Society* 19, 197–203.

Lim C., Dominy W., 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 87, 53-63.

Lim C., Dominy W., 1991. Utilization of plant proteins by warm water fish. In: Akiyama, D.M., Tan, R.K.H. (Eds.), *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*, September 19-25. American Soybean Association, Singapore, pp. 245-251.



Lim C., Dominy W., 1992. Substitution of full-fat soybeans for commercial soybean meal in diets for shrimp, *Penaeus vannamei*. Journal Applied Aquaculture 3, 35-45.

Lim, C., 1996. Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. Journal of World Aquaculture Society 27, 402-409.

Lim, C., Beames, R.M., Eales, J.G., Prendergast, A.F., Mclesse, J.M., Shearer, K.D. Higgs, D.A., 1997. Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture Research 3, 269-279.

Martínez-Rocha, L., Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., Cruz-Suarez, L.E. 2012. Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. Aquaculture Research, <http://doi.org/10.1111/j.365-2109.2011.03083.x>.

McGinnis, A.J., Kasting, R., 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. Agricultural and Food Chemistry 12, 259-262.

Molina-Poveda, C., Morales, M.E., 2004. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research 35, 1158-1165.

Moon, H.Y., Gatlin, D.M. III, 1991. Total sulfur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture 95, 97–106.

Moorthy, M.S., Altaff, T.N., 2002. Role of natural productivity in modified extensive shrimp pond growing *Penaeus monodon* (Penaeid, Crustacea). Indian Journal of Marine Sciences 312, 195-200.

Morris, T., Samocha, T.M., Davis, D.A., Fox, J.M., 2011. Cholesterol supplements for *Litopenaeus vannamei* reared on plant bases diets in the presence of natural productivity. Aquaculture 314, 140-144.

Moss, S. M., Pruder, G. D., Leber, K. M., Wyban, J. A., 1992. The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond water. *Aquaculture* 101, 229-239.

Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 187, 175-191

Moss, S. M., Divakaran, S., Kim, B.G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 32, 125-131

Moss, S. M., Forster, I. P., Tacon, A. G. J., 2006. Sparing effect of pond water on vitamins in shrimp diets. *Aquaculture* 258, 388-395.

Oujifard, A, Seyfabadi, J., Kenari, A.A., Rezaei, M., 2012. Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish meal. *Aquaculture* 342-343, 56-61.

Paripatananont, T., Boonyaratpalin, M., Pengsen, P., Chotipunntu, P., 2001. Substitution of soy protein concentrate for fishmeal in diets of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 32 (Suppl. 1), 369-374.

Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Villacrés, E., Rivera, M., Subia, C., 2009. Catalogo de variedades mejoradas de granos andinos: Chocho, Quinoa y Amaranto, para la sierra del Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. Publicacion Miscelanea No. 151. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA). Estación Experimental Santa Catalina, INIAP. Quito, Ecuador. 24pp.

Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2004. Evaluation of micronized lupin seed meal as an alternative protein source in diets for gilthead sea bream *Sparus aurata* L. juveniles. *Aquaculture Research* 35, 828-835.

Petterson, D.S., 2000. The use of lupins in feeding systems-review. Asian-Australian Journal of Animal Science 13, 861–882.

Piedad-Pascual, F., Cruz, E., Sumalangcay, A., 1990. Supplemental feeding of *Penaeus monodon* juveniles with diets containing various levels of defatted soybean meal. Aquaculture 89, 183-191.

Rahman, S.A., Razek, F.A., Goda, A.M., Ghobashy, A.F., Taha, S.M., Khafagy, A.R., 2010. Partial substitution of dietary fish meal with soybean meal for speckled shrimp, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1789) (Decapoda: *Penaeidae*) juvenile. Aquaculture Research 41, 299-306.

Richard, L., Surget, A., Rogolet, V., Kaushik, S., Geurden, I., 2011. Availability of essential amino acids, nutrient utilization and growth in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following fishmeal replacement by plant protein. Aquaculture 322-323, 109-116.

Sá, M.V.C., Sabry-Nieto, H., Cordeiro-Junier, E., Nunes, A.J.P., 2012. Dietary concentration of marine oil affect replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, <http://doi.org/10.1111/j.1365-2195.2012.00954.x>.

Saraç, H.Z., Thaggard, H.B., Rose, J., Kelly, B.J., Gravel, M.R., 1998. Utilisation of Plant Protein Sources. In: Smith, D.M. (Ed), Fishmeal Replacement in Aquaculture Diets for Prawns. Final Report of Project 93/120-02 to the Fisheries Research and Development Corporation, Canberra, Australia, pp 168. In Glencroos, B.D., 2001. Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. 126pp.

Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer H. D., Elmadfa, I., 1982. Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. Journal of Nutrition 112, 70-76.

Serrano, E., Storebakken, T., Penn, M., Landsverk, T., Hansen, J. Ø., Mydland, L. T., 2008, Responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary dose of lupinine alkaloid. In Palta, J.A., Berger, J.B. (Eds). 2008. 'Lupins for Health and Wealth' Proceedings of the 12th International Lupin Conference,

14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.

Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry* 127, 1409-1426.

Smith, D. M., Tabrett, S. J., Glencross, B. D., 2007a. Growth response of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* fed diets containing different lupin cultivars. *Aquaculture* 269, 436-446.

Smith, D. M., Tabrett, S. J., Irvin, S. J., Wakeling, J., Glencross, B. D., Harris, D., 2007b. Response of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* to feed containing the lupin alkaloid, gramine. *Aquaculture* 272, 556-563.

Sookyin, D., Davis, D.A., 2011. Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture* 319, 141-149.

Suárez, J.A., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., Suárez, A., Faillace, J., Cuzonc, G., 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 289, 118-123.

Sudaryono, A., 2001. Water pellet stability studies on lupin based shrimp (*Penaeus monodon*) aquaculture feeds: comparison of lupin meal with other dietary protein sources. *Journal of Coastal Development* 3, 129-140.

Sudaryono, A., 2003. The performance of lupin meal as an alternative to fishmeal in diet of juvenile *Penaeus monodon* under pond conditions. *Journal of Coastal Development* 6, 71-82.

Sudaryono, A., 2004. Comparison of lupin meals based diets cost efficiency for juvenile *Penaeus monodon* tested under pond conditions. *Journal of Coastal Development* 8, 47-51.

Sudaryono, A., Hoxey, M., Kailis, S., Evans, L.H., 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 134, 313-323.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Evans, L.H., 1996. Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 143, 331-340.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Evans, L.H., 1999a. Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquaculture Nutrition* 5, 277-285.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Hutabarat, J., Supriharyono, A., Evans, L., 1999b. Lupin ingredients in shrimp (*Penaeus monodon*) diets: influence of lupin species and types of meals. *Aquaculture* 171, 121-133.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Evans, L.H., 1999c. Replacement of Soybean meal by Lupin meal in practical diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Journal World Aquaculture Society* 30, 46-57

Syama-Dayal, J., Rajaram, V., Ambasankar, K., Ahamad-Ali, S., 2011. Sunflower oil cake as a replacement for fish meal in feeds of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in tanks and in net cages. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 40, 460-470.

Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121-137.

Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146-158.

Trugo, L.C., Almeida, D.C.F., 1988. Oligosaccharide contents in the seeds of cultivated lupins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 45, 21-24.

Xie, F., Zeng, W., Zhou, Q., Wang, H., Wang, T., Zheng, C., Wang, Y., 2012. Dietary lysine requirements of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 358-359, 116-121.

Zar J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 663pp.

**Aquaculture 2013, 410–411: 148-156**

### 3.2 Utilization of corn gluten meal as a protein source in the diet of white shrimp *Litopenaeus vannamei*

Cesar Molina-Poveda<sup>1</sup>, Mariela Lucas<sup>1</sup>, Miguel Jover<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENAIM-ESPOL. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Campus Gustavo Galindo. Km. 30.5 Vía perimetral. P.O. Box 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. E-mail: [cmolinapoveda@gmail.com](mailto:cmolinapoveda@gmail.com)

<sup>2</sup> Biodiversity and Aquaculture Group. Institute of Animal Science and Technology. Universitat Politècnica de Valencia. Camino de Vera, s/n. 46071 Valencia (Spain). E-mail: [mjover@dca.upv.es](mailto:mjover@dca.upv.es)

**Corresponding author:** Cesar Molina-Poveda. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Campus Gustavo Galindo. Km. 30.5 Vía perimetral. P.O. Box. 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. (Actually in GISIS. km 6.5 vía Duran – Tambo. P.O. Box 09-12-4678. Guayaquil, Ecuador). E-mail: [cmolinapoveda@gmail.com](mailto:cmolinapoveda@gmail.com)

#### Abstract

A 57-day feeding trial was designed to assess the potential of corn gluten meal (CGM) as a plant protein source in practical feeds for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Five experimental diets providing 35% protein and 11% lipid were prepared, where 0, 25, 50, 75 and 100% of fish meal (FM) protein was substituted by protein from CGM.

The results showed that partial or complete replacement of FM with CGM did not affect survival. The growth of the shrimp declined as the levels of CGM increased, diets containing CGM showing a significantly lower final weight (3.2-5.9 g) and specific growth rates (1.7-2.7% d<sup>-1</sup>) compared to those fed on the diet with 0 CGM (7.1 g and 3.0 % d<sup>-1</sup>). Feed conversion ratio was also significantly affected by CGM level. The inclusion of CGM resulted in a statistical decrease in the apparent digestibility of dry matter from 77.88 to 66.0% and in apparent digestibility of protein from 80.5 to 52.0%, of feed. The apparent digestibility of amino acids, with the exception of lysine, declined with

the dietary incorporation of CGM. In summary, reduced palatability, low protein digestibility and a deficiency of lysine and methionine seem to be the major reasons behind a depressed growth in shrimp fed on CGM protein-based diets.

**Keywords:** Plant protein, shrimp growth, amino acid digestibility

## 1. Introduction

Commercial aqua feeds usually contain fish meal (FM), which is expensive and not always readily available. The FAO has reported that the world capture fisheries are now stabilized at approximately 90.4 million tons per year and this figure is not expected to increase since the maximum potential for exploitation in half of the world's fishing areas has been reached and 32% overexploited or depleted (FAO 2012). Meanwhile aquaculture keeps growing by more than 8.8% annually thus, excluding aquatic plants, production has grown from less than one million tons per year in the early 1950s to 63.6 million tons in 2011 (FAO 2012). Aquaculture is seen as a solution to the growing demand for fish since it has partially met the current human consumption requirements. It is also true that the requirements for the maintenance of livestock such as shrimp and salmon mean that large amounts of FM and fish oil are needed for the production of artificial feed (Tacon & Metian 2008).

Based on these observations, the global FM supply available for aquaculture is expected to be limited to the current level and the high demand for FM has raised the price since 2000, to a record of US\$ 2100/ton in 2012 (Molina-Poveda et al. 2013). This directly affects the formulation costs of diets for farmed species in aquaculture, and makes the search for new, more economical, protein sources necessary. FM naturally contains a well-balanced mixture of essential amino acids and other nutrients which are readily digested (Suárez et al. 2009). However, the world supply of FM, which is mainly derived from capture fisheries, is heavily influenced by climatic events such as El Niño (Pontecorvo 2001) and growing demand.

*Litopenaeus vannamei* farming is a growing economical activity for many developing countries (Naylor 2000). FM is a protein source with a high nutritional value and palatability, and usually constitutes between 5 to 40% of the manufactured shrimp feeds (Tacon & Metian 2008). The search for



alternative protein sources with a high nutritional quality at a reasonable cost is a current concern among shrimp farmers (Sudaryono et al. 1995, 1999).

The replacement of FM in shrimp feeds with varying plant proteins has been an important focus for many investigators; including soy bean (Lim & Dominy 1990, 1992; Davis et al. 2004), cottonseed (Lim 1996), canola meal (Lim et al. 1997), pea meal (Davis et al. 2002; Martínez-Rocha et al. 2012), barley-based fermented grains (Molina-Poveda & Morales, 2004), a mixture of plant and poultry by-products (Amaya et al., 2007a,b), algae (Hanel et al. 2007; Ju et al. 2009), a mixture of plant protein soybean, canola and millo (Suárez et al. 2009; Sookying & Davis 2011), Jatropha kernel meal (Harter et al. 2011), a mixture of meat, poultry, blood and corn gluten meal (Ye et al. 2011, 2012), soy protein concentrate (Sá et al. 2012; Bauer et al. 2012), rice protein concentrate (Oujifard et al. 2012) and lupin meal (Molina-Poveda et al. 2013).

Among the plant proteins which are considered to be excellent and rich protein sources, is corn gluten. Corn gluten meal (CGM), which typically contains more than 60% protein and low levels of phosphorus, is the major protein fragment derived from wet milling as along with corn distillers' grains with soluble. The wet-milling process separates corn into starch, protein, germ, oil, and fiber fractions. Likewise, corn is the predominant cereal grain used for ethanol fermentation; as more starch is converted to ethanol fuel and high-fructose corn syrup, more CGM is produced. This protein-rich ethanol by-product with a consistent quality is being increasingly used in aquaculture feed formulations.

Lorico-Querijero & Chiu (1989) found that the true digestibility of CGM by Nile tilapia was 97%, and satisfactory growth rates and feed utilization results have been obtained in diets for fish. CGM as a substitution for FM in fish diets has been studied by a number of investigators; including studies of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Moyano et al. 1991; Morales et al. 1994), gilthead seabream *Sparus aurata* (Robaina et al. 1997), yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Shimeno et al. 1993), rodaballo *Psetta maxima* (Regost et al. 1999) and tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (Wu et al. 1995, 1998, 2000). The combination of soybean meal and corn gluten meal has successfully replaced up to 63% of FM in rainbow trout diets (Pongmaneerat & Watanabe

1992). In general, it is reported that 20-40% of dietary FM protein can be replaced by CGM, but a total replacement of FM by CGM induces a growth reduction of nearly 30%.

The use of dietary CGM in combination with other ingredients such as soybean meal and rendered animal in white shrimp *L. vannamei* feed has also been examined (Amaya et al. 2007b; Markey et al. 2010; Ye et al. 2011). However, the effect of the partial or complete substitution of FM with CGM on the growth response of marine white shrimp has not yet been studied- although Richard et al. (2011) have studied the inclusion of CGM in diets of tiger shrimp *P. monodon*.

The purpose of this study was to determine the effect of the inclusion of corn gluten meal as a substitution for FM, on the digestibility, ingestion, growth and survival rates of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The shrimp were fed different experimental diets with the same dietary protein and energy content over the period of an 8-week growing cycle.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Diet formulation and preparation**

First quality steam-dried FM was produced by Pesquera Polar (Salango, Ecuador). The CGM used in the present study was supplied by Industrias del Maíz S.A. (Cali, Colombia) and contained 92.1% dry matter, 61.8% crude protein, 1.3% crude fat, 1.9% ash, 16.57 mJ digestible energy per kg, and 250 mg xanthophylls per kg, on an as-is basis.

For the growth trial five isonitrogenous and isoenergetic gross energy experimental diets were formulated to contain 35% protein and 11% lipid, with 0, 25, 50, 75 and 100% of FM protein substituted by CGM on a protein basis. CGM was the main source of dietary plant protein in the feeds, although all the diets contained 10% squid meal as an attractant source, and 5% wheat gluten (Table 1). No supplementary amino acids were added to the diets. Only the corn starch (33.5 to 36.9%) and fish oil (5.3 to 7.0%) contents of the diets varied to keep the protein and lipid content of the diets constant in all the treatments.

**Table 1. Ingredients and proximate composition of the diets.**

<b>Ingredients</b>	<b>CGM0</b>	<b>CGM25</b>	<b>CGM50</b>	<b>CGM75</b>	<b>CGM100</b>
Fish meal <sup>1</sup>	32.91	24.68	16.46	8.23	0.00
Corn gluten meal <sup>2</sup>	0.00	8.64	17.28	25.92	34.56
Corn starch <sup>3</sup>	36.44	35.61	34.74	33.88	33.03
Fish oil	5.28	5.70	6.15	6.60	7.04
Squid meal <sup>4</sup>	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Wheat gluten <sup>5</sup>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Lecithin liquid	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cholesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamins premix <sup>6</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Minerals premix <sup>7</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Antioxidant	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Mold inhibitor	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Carboxymethyl cellulose	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Astaxantine	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chromic oxide	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
<b>Proximate composition (% as dry matter basis)</b>					
Moisture (as was at mixing)	8.44	8.13	8.13	9.52	6.01
Crude protein (Nx6.25)	35.21	36.79	34.38	35.95	34.74
Crude lipid	11.23	10.82	11.25	11.15	11.24
Carbohydrate <sup>8</sup>	37.92	35.22	38.29	36.57	42.19
Ash	7.20	9.02	7.91	6.83	5.82
Energy (kJ/g dry matter) <sup>9</sup>	17.7	17.5	17.7	18.0	18.2

<sup>1</sup>Produced by steam dry method (69.7% crude protein c.p.; 6.9% fat). Polar, Salango, Ecuador.

<sup>2</sup>Corn gluten meal (61.8% c.p.; 1.3% crude fat). Industrias del Maíz S.A. (Cali, Colombia)

<sup>3</sup>Purchase from Sumesa S.A., Guayaquil, Ecuador

<sup>4</sup>Processed in the laboratory by liophilized from commercial frozen baby squid *Loligo* sp (80.4% c.p.; 4.3% lipid)

<sup>5</sup>Purchase from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA

<sup>6</sup>(mg 100g<sup>-1</sup> diet): p-aminobenzoic acid, 10; thiamin-HCl, 12; riboflavin, 20; pyridoxine-HCl, 12; choline chloride, 250; nicotinic acid, 75; calcium pantothenate, 50; inositol, 200; biotin, 0.5; folic acid, 1.5; ascorbic acid, 10; menadione, 4; α-tocopherol acetate, 40; cyanocolabamine, 0.03; cholecalciferol, 0.03; β-carotene, 1.15 10<sup>-3</sup>.

<sup>7</sup>(mg 100g<sup>-1</sup> diet): calcium phosphate monobasic, 272; calcium lactate, 640.2; ferric citrate, 60; magnesium sulphate heptahydrate, 274; potassium phosphate, 480; sodium phosphate monobasic, 174; sodium chloride, 86; aluminium chloride, 0.4; potassium iodide, 0.3; cuprous chloride, 0.2; manganous sulfate monohydrate, 1.6; cobalt chloride hexahydrate, 2.1; zinc sulphate heptahydrate, 7.1; sodium selenite, 2.

<sup>8</sup>Calculated value: carbohydrate=total-(ash+crude protein+moisture+total lipid).

<sup>9</sup>Total calories was calculated using following factors: 23 kJ/g protein; 35 kJ/g lipid; 15 kJ/g carbohydrate

Table 1 shows the nutrient composition of the experimental diets while the amino acid content is presented in Table 2. A commercial diet (36.5% protein, 10.9% lipid, 31.4% carbohydrate, 13.4% ash and 16.9 MJ kg<sup>-1</sup>) was used as an external reference in the growth trial.

**Table 2. Amino acid profile of the experimental diets (g AA/16g Nitrogen).**

	<b>CGM0</b>	<b>CGM25</b>	<b>CGM50</b>	<b>CGM75</b>	<b>CGM100</b>
Arginine	5.4	4.4	4.3	3.5	3.3
Histidine	2.5	2.0	2.0	1.6	1.8
Isoleucine	4.0	3.5	3.6	3.1	3.4
Leucine	7.3	7.9	9.0	10.4	13.2
Lysine	5.4	4.3	4.1	2.3	1.8
Methionine	2.5	2.0	2.0	1.8	1.7
Phenylalanine	3.9	3.6	4.0	4.0	4.8
Threonine	3.9	3.3	3.3	2.8	3.0
Valine	4.6	4.1	4.2	3.6	3.9
Sum of analyzed EAA	39.5	35.2	36.4	33.2	36.9
Alanine	7.1	6.2	7.1	8.4	10.0
Aspartic acid	9.0	7.9	7.4	6.1	6.2
Glutamic acid	19.2	19.1	21.0	22.2	26.8
Glycine	6.9	5.4	4.9	4.1	3.6
Proline	4.9	4.7	4.9	5.2	6.4
Serine	3.8	3.6	3.8	3.7	4.4
Tyrosine	3.0	2.6	2.9	3.0	3.2
Sum of analyzed AA	95.2	84.8	88.7	86.0	97.6

All the macro-ingredients (FM, squid meal, CGM) were ground in order to pass through a 0.30-mm mesh screen and then mixed by hand to obtain a homogenous mixture. A small proportion of this mixture was removed and homogenized with the micro-ingredients (vitamin mix, cholesterol, etc.), and

then reincorporated into the remaining macro-ingredients and mixed again. The oil-based ingredients (fish oil, lecithin) were then added and finally, water (40-50%) was added to obtain a firm paste. The semi-moist mixture was pelleted in the food grinder using a 2-mm die reaching a temperature of 70 – 75 °C. The resulting spaghetti-like strands were dried in an air-draft oven at 60 °C until the moisture content was less than 10%. After drying, the strands were broken up into pellets of about 1 cm in length, packed in sealed plastic bags and then stored at -10 °C until use.

## 2.2. Palatability of diets

During the sixth and seventh week, the shrimps were fed the experimental diets *ad libitum* at 08:00 and 16:00 h. In order to estimate feed acceptance based on the ingestion rate over 13 consecutive days, uneaten feed was collected two hours after each feeding by siphoning using a previously weighed 300-µm mesh size net. The uneaten feed was then dried at 60 °C for 24 h and then weighed to estimate the percentage of feed consumption according to the stocked biomass in each aquarium. A factor “F” was introduced to correct for feed loss due to water movement, aeration, siphoning and rinsing during the time that the feed was in the water. In order to determine this factor 10 aquaria without shrimp were used and a known amount of feed was placed inside for two hours. The amount of feed consumed by shrimp was expressed as a percentage of the biomass of the shrimp in the aquaria and used as an indicator of diet palatability, using the expressions:

$$\text{Palatability} = \frac{\text{Supplied feed} - (\text{Non consumed} \times F)}{\text{Biomass in aquarium}} \times 100$$

$$\text{Correction Factor (F)} = \frac{\text{Supplied feed}}{\text{Retrieved feed}}$$

## 2.3. Pellet water stability

The pellet water stability (PWS) was determined as per the method described by Molina-Poveda et al. (2013); a horizontal shaking method using a heated circulating water bath with shaker (EYELA Model NTS-120, Japan). The shaker tray held up to six 200-ml flasks in each test run. Each flask was filled with

100ml seawater (35 g/L) and 2 g of feed. The shaker speed was adjusted to 70 rpm and water temperature to 28 °C. After 2 h of continuous immersion, the pellets were recovered using a filtration apparatus with a 1-mm metallic mesh. The pellets were dried in a convection oven at 60 °C for 24 h and then cooled in a desiccator. The stability of the diets was determined in triplicates and expressed as the percentage of dry matter remaining.

$$PWS = 100 - \left( W_{\text{dry before immersion}} - W_{\text{dry after immersion}} \right) \times 100$$

#### 2.4. Digestibility assay/evaluation of digestibility

Over the course of seven days the shrimp were fed their assigned diets that had been supplemented with 0.5% chromic oxide in order to acclimatize them to the new feed. The supplied feeds were left in the water for an hour and then uneaten feed and faeces were removed. Collection of the faecal material was performed 2h after feeding by siphoning. Faeces from the same aquarium were collected every day at 10:00 and 16:00 h and pooled in 30 individual Eppendorf tubes. The faeces were rinsed in distilled water to remove any salt and kept in an ice bath until the end of the day. They were then centrifuged for 5 min at 13000 rpm in a refrigerated centrifuge at 4 °C to decant and discard excess water. Thirty pools of 10 days worth of faeces were frozen in Eppendorf tubes at -80 °C. The faeces were then dried for 48h in a freeze drier. The dried faeces were ground to a fine and homogeneous powder in Eppendorf tubes with a metallic piston. Afterwards, the powdered faeces were oven dried for 24h at 60°C and kept in a dry atmosphere. Silica gel was used to ensure complete dryness at the time of weighing. The levels of protein and chromic oxide in the faeces and diets were analyzed in the six replicate following the procedure described by Foster & Gabbot (1971) and McGinnis & Kasting (1964), respectively.

The apparent digestibility (AD) of the test diets was calculated using the formula:

$$AD = 1 - \frac{(\% \text{ nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3) \text{ faeces}}{(\% \text{ nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3) \text{ diets}} \times 100$$

#### 2.5. Growth trial in the laboratory

The growth trials and digestibility bioassays were conducted at the facilities of the National Aquaculture and Marine Research Centre (CENAIM), San Pedro de Manglaralto (Guayas Province, Ecuador). The growth trial was conducted in 50-L, flow-through (42% seawater exchange per hour) aerated polyethylene aquaria (0.18 m<sup>2</sup>). The seawater passed through sand and cartridge (5µm) filters and a UV light unit before entering the aquaria. The water flow rates were checked and adjusted daily to ensure a proper water exchange rate. Each aquarium, filled with 50 L of seawater, was provided with a tight fitting net cover and continuous aeration with an air stone. Juvenile *Litopenaeus vannamei* ranging from 0.76 to 1.90 g (average 1.23 ± 0.18 g) were stocked at a density of 44 shrimps per m<sup>-2</sup> (8 shrimp per aquarium. Shrimp that died within 48 h after stocking were replaced by shrimp of a similar size.

Each test diet was fed to the shrimp four times (08:00, 12:00, 16:00 and 20:00 h) daily to apparent satiation during the first five weeks and then lowered to twice daily (08:00 and 16:00 h). A photoperiod of 12h light and 12h dark was maintained using 40-W fluorescent tubes (General Electric, USA). A weekly measurement of the seawater quality revealed that the temperature and salinity were 27.3±0.9 °C and 35±1 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The dissolved oxygen concentration was maintained above 5.0 mg L<sup>-1</sup>. Six replicate aquaria were assigned to each treatment and in addition six aquaria were used to test an Ecuadorian commercial feed (35% protein, 11% lipid) as an external reference diet. The six diets as well as the animals were randomly allocated to the 36 aquaria. The amount of feed given each day was recorded over the course of two months.

At the end of the 8-week growth trial, all the shrimp were weighed to the nearest 0.01g using a digital scale, and counted. The final mean weight, survival, specific growth rates, feed intake and feed conversion ratios were used to evaluate the effect of the substitution in the diet. Every morning, before the first feeding, all the aquaria were cleaned by siphoning off the accumulated waste materials and exuviae. Every two weeks, the shrimp in each aquarium were

counted and weighed *in mass*. When the shrimp were sampled, each aquarium was thoroughly cleaned, drained and refilled.

## 2.7. Performance parameters

The growth parameter used to evaluate the quality of diets was calculated using the following equation:

$$\text{Specific growth rate (SGR; \% day}^{-1}\text{): } SGR = \left[ \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t(\text{days})} \right] \times 100$$

Daily feed intake (DFI, %/d) was calculated using the expression:

$$DFI = \left[ \frac{\text{Supplied feed}}{\text{Average Biomass}} \times 100 \right] / t(\text{days})$$

The feed conversion ratio (FCR) was estimated using the formula presented by Brand and Colvin (1977) for correcting dead shrimps:

$$FCR = \frac{\text{Total feed supplied}}{B_f + \left[ \sum \frac{W_i + W_f}{2} \times N \right] - B_i}$$

Where  $B_f$  = final biomass,  $B_i$  = initial biomass,  $W_i$  = average initial weight in each period,  $W_f$  = average final weight in each period,  $N$  = number of dead shrimp in each period.

## 2.8. Analytical methods

The feed ingredients and diets were milled to fine powder (300  $\mu\text{m}$ ) and their proximate compositions were analyzed using standard laboratory procedures (AOAC 1990). Dry matter was calculated from the weight loss after drying in an oven at 105  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h. Crude protein (%N $\times$ 6.25) was measured using the Kjeldahl method after acid digestion. Crude fat was calculated after extraction with diethyl ether extraction (Soxhlet technique). Ash was determined after ignition of the samples at 550  $^{\circ}\text{C}$  for 4 h in a muffle furnace. Amino acids were determined by high-performance liquid chromatography (Shimadzu, Japan) after hydrolysis of samples in 6 N HCl for 24 h at 110  $^{\circ}\text{C}$ . Then, samples were derivatized with o-phthalaldehyde (OPA) as per the method described by



Antoine et al. (1999). Tryptophan could not be quantified because of its degradation during acid hydrolysis.

## 2.9. Statistical analysis

The Anderson-Darling test was used to check for normality. Bartlett's test for homogeneity of variance was employed with  $P=0.05$  (Zar 1999). All the data was subjected to the one-way analysis of variance (ANOVA) test ( $P<0.05$ ), with the initial weight considered covariate. Where ANOVA revealed significant differences, a Student-Newman-Keul's multiple comparison test at  $P<0.05$  was applied to characterize and quantify the differences between the treatments using Statgraphics (Statistical Graphics System, Version Centurion, Herndon, VA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Stability and palatability of experimental diet

The pellet stability after 2 h of immersion in water (Table 3) was significantly ( $P<0.05$ ) improved by the inclusion of CGM. The diet CGM0 resulted in a lower retention of dry matter (82.2%) than the CGM diets (85.7-86.8%). The commercial diet had lowest value of stability 69.7%.

**Table 3. Pellet water stability (PWS) and palatability of diets containing different replacements levels of fishmeal by corn gluten meal.**

DIET	CGM0	CGM25	CGM50	CGM75	CGM100	SEM
Pellet water stability (%)	82.2 <sup>a</sup>	86.8 <sup>b</sup>	86.0 <sup>b</sup>	86.2 <sup>b</sup>	85.7 <sup>b</sup>	0.55
Palatability (% d <sup>-1</sup> )	8.40 <sup>a</sup>	6.53 <sup>b</sup>	5.14 <sup>c</sup>	4.03 <sup>d</sup>	3.10 <sup>e</sup>	0.25

Mean of three replicates for PWS and thirteen replicates for Palatability.

SEM = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ )

The laboratory trial results revealed a clear inverse relationship between CGM dietary levels and palatability, varying from 8.4% d<sup>-1</sup> in diet CGM0 to 3.1% d<sup>-1</sup> in diet CGM100. The palatability for the commercial diet was 4.19%.

### 3.2. Digestibility

The apparent dry matter digestibility (ADMD) of diet CGM0 was significantly higher, 78.5%, than that of the other diets, which ranged between 66.1 and 70.7% (Table 4). There was a significant inverse relationship between apparent protein digestibility (APD) and the dietary level of CGM. CGM0 had the highest ADMD value (80.5%), whereas diets CGM25 and CGM50 had average ADMD values, (63-69%) and CGM75 and CGM100 had the lowest (52-55%) values (Table 4).

**Table 4. Apparent dry matter (ADMD) and protein (APD) digestibility of diets containing different replacements levels of fishmeal by corn gluten meal.**

DIET	CGM0	CGM25	CGM50	CGM75	CGM100	SEM
ADMD (%)	78.5 <sup>a</sup>	70.7 <sup>b</sup>	66.1 <sup>b</sup>	68.9 <sup>b</sup>	69.1 <sup>b</sup>	1.65
APD (%)	80.5 <sup>a</sup>	68.7 <sup>b</sup>	62.6 <sup>c</sup>	55.1 <sup>d</sup>	52.0 <sup>d</sup>	1.65

Mean of six replicates.

SME = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05)

The Apparent Digestibility (ADAA) of most of the amino acids, except lysine and glycine, decreased with the incorporation of CGM, reflecting ADCP. On average, both essential amino acid (EAA) and non essential amino acid (NEAA) digestibility was similar, around 85% in the CGM0 diet and 72-71, 61-62, 57-61 and 57-59 % respectively in diets CGM25, CGM50, CGM75 and CGM100.

The ADAA in the CGM0 diet ranged from 80.3 to 90.8% with the exception of Phenylalanine (77.5%), whereas in the other diets it ranged from 36.9 to 87.8%. Among the single AA, availability of phenylalanine was the most affected (-22%

in diet CGM25 and -40% in diet CGM100), followed by histidine (-21% in diet CGM25 and -33% in diet CGM100). The digestibility of lysine was the highest, and similar values were observed in all five diets, between 84 and 91%.

### 3.3. Survival, growth, and feed performance

The growth, survival and feed performance parameters are shown in Table 5. No differences in initial individual weight using ANOVA indicated that the shrimp were homogeneously distributed between the treatments and replicates at stocking. The final weight (3.5 g) and SGR (1.87 % d<sup>-1</sup>) of the shrimp fed the commercial diet are not included in Table 5, but they were lower than the results from most of the experimental diets.

**Table 5. Growth performance of white shrimp, *L. vannamei* reared for 57 days in 50-L indoor aquaria and fed the experimental diets containing different replacements levels of fishmeal by corn gluten meal.**

DIET	CGM0	CGM25	CGM50	CGM75	CGM100	SEM
Initial weight (g/shrimp)	1.19	1.37	1.18	1.19	1.23	0.05
Final weight (g/shrimp)	7.07 <sup>a</sup>	5.89 <sup>b</sup>	5.68 <sup>b</sup>	4.65 <sup>c</sup>	3.24 <sup>d</sup>	0.31
SGR (% d <sup>-1</sup> )	3.04 <sup>a</sup>	2.75 <sup>b</sup>	2.68 <sup>b</sup>	2.32 <sup>c</sup>	1.70 <sup>d</sup>	0.08
Survival (%)	81.2	84.5	76.9	89.5	89.7	6.00
FCR	2.74 <sup>ab</sup>	2.50 <sup>a</sup>	3.35 <sup>bc</sup>	3.94 <sup>c</sup>	5.16 <sup>d</sup>	0.22

Mean of six replicates using initial weight as covariate

SME = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different (P< 0.05)

There were no differences in survival, which ranged from 77 to 90%, but there were statistical differences (P<0.05) in SGR and FCR between the treatments. An inverse relationship between final weight and SGR and the CGM dietary level was observed, with the shrimp fed diet CGM0 displaying the highest weight (7.1 g), and the shrimp fed CGM75 and CGM100 showing the lowest weight (4.6 and 3.2 g respectively). The shrimp fed diets CGM25 and CGM50 displayed intermediate/average values (5.7-5.9 g). FCR was lower (P<0.05) in

diets CGM0 and CGM25 than in the other diets. Diet CGM100 had the poorest FCR.

#### 4. Discussion

Growth was clearly lower in the shrimps fed the diets containing CGM, than those fed diet CGM0 without this ingredient (Table 5). Therefore it appears that CGM cannot be used to replace FM in *Litopenaeus vannamei* diets, even at levels as low as 8.6% CGM and 25% FM.

This significant reduction in growth rates with FM replacement levels of 25% or higher (diets containing 25, 16, 8 or 0% of FM) does not concur with previous research where the successful growth of white shrimp, *L. vannamei*, fed 6% FM using rapeseed (canola) meal, soybean meal, canola and wheat flour (Suárez et al. 2009), fermented grains and wheat gluten (Molina-Poveda & Morales 2004), rice protein concentrate (Oujifard et al. 2012), soy protein concentrate (Sá et al. 2012), a mixture of soy bean meal and microbial floc meal (Bauer et al. 2012), a mixture of soy bean meal and animal meats (Ye et al. 2012). This therefore seems to suggest that the effect of CGM is negative.

Nevertheless, others authors such as Amaya et al. (2007a) and Markey et al. (2010) who used a diet without FM but with several other plant ingredients, including 4.8% CGM, reported a good performance in *L. vannamei* reared in ponds. Ye et al. (2011) stated that a combination of various rendered animal ingredients with CGM (5%) may be adequate in terms of nutritional value, and provide a suitable alternative to FM as a protein source in practical diets for shrimp. Likewise, Sooking & Davis (2011) obtained excellent results with plant based diets containing 4.8% corn gluten, but the inclusion of 9% corn gluten in diets with high levels of soybean meal had a negative effect (Davis et al. 2004). Likewise, a poor growth performance was obtained in *L. vannamei* fed a diet containing 15% CGM and 0% FM, in comparison to white shrimp fed 14% soybean (Forster et al. 2002).

Similarly, Richard et al. (2011) reported no benefit to the growth performance of *P. monodon* reared in earthen ponds for 144 days, of diets containing about 34% FM over diets containing 24% FM and 11% CGM in combination with

wheat gluten, soybean meal, sorghum. This suggests that shrimp require a CGM level lower than 11% both in laboratory rearing systems and in ponds.

CGM has been used as a partial substitute for dietary FM in several species without the supplementation of essential amino acids. Shimeno et al. (1993), studying yellowtail, concluded that the appropriate replacement level of FM protein with CGM was 13-26%. On the other hand, Morales et al. (1994) and Robaina et al. (1997) showed that replacing up to 40% FM protein with CGM resulted in no adverse effects on the growth of rainbow trout and gilthead sea bream, respectively.

The depressed growth exhibited by shrimp fed high inclusions of CGM could have resulted from a number of factors including reduced feed intake, protein digestibility in the formulated diets, deficiencies in essential nutrients, etc.

The low palatability of the diets containing a reduced FM content has been seen in previous studies (Molina-Poveda et al. 2013), and the utilization of more than 10% of other marine protein feedstuffs (i.e., squid or shrimp meal), a common practice to facilitate higher FM replacement levels (Smith et al. 2000), did not stimulate feed consumption.

The water stability of the pellets ranged from 82 to 86%, similar to the data reported by Molina-Poveda et al. (2013). However, the effect of the inclusion of a plant protein was lower, because those authors reported 90-95% stability in diets without FM.

The results of the present study clearly indicate that the digestibility (ADDM) of diet CGM0 was higher than that of any of the other diets containing CGM. Likewise, protein digestibility (ACPD) tended to decrease as the levels of CGM increased, and was very low (52-55%) in the diets containing high CGM levels. These ACPD values are the lowest cited in white shrimp with other ingredients resulting in higher ACPD; 74-83% with pea (David et al., 2002), 87-91% with poultry by-products (Cruz-Suárez et al. 2007), 81-93% with rendered by-products (Forster et al. 2003), 73-85% with porcine meat meal (Hernández et al. 2008, 2011), 76-83% with a terrestrial animal mixture with CGM (Ye et al. 2011), 78-80% with shrimp head meal (Ye et al. 2012), and 75.5 to 77.6% in

diets containing 9-36% lupin meal (Molina-Poveda et al. 2013). The only exception was with diets containing 46% rice protein concentrate where the ACDP was just 52% (Oujifard et al. 2012). Additionally, when also studying *L. vannamei*, Espinoza (2013) reported that the ADCP of Corn Protein Concentrate was 63%. This is despite it being a more refined ingredient with a higher level of protein (75% versus the 60% of corn gluten) and the fact that the experimental diet was extruded at 110 °C and 40-50 atm. These results would seem to suggest that plant protein ingredients are more poorly digested than animal derivatives. These differences are not however evident in papers published by Lemos et al. (2009) and Yang et al. (2009), who studied the ACPD of several ingredients, including CGM, using a reference diet. Both authors reported a very different ACPD of CGM, with Lemos et al. (2009) reporting a value of 59%, and Yang et al. (2009) 88%, suggesting a difference in the production process of CGM could exist.

These results are contradictory because CGM is usually found to be a highly digestible protein source in species such as tiger shrimp (Richard et al. 2011), tilapia (Wu et al. 1995), rainbow trout (Gaylord et al. 2010), Atlantic cod (Tibbetts et al. 2006) and sea bream (Pereira & Oliva-Teles 2003), whereas it is poorly digested by Japanese seriola (Masumoto et al. 1996) and turbot (Regost et al. 1999). This could be due to anatomical and physiological differences in digestive systems of the species (Pereira & Oliva-Teles 2003).

The amino acid availability generally reflected the crude protein digestibility of the experimental diets, with the average ADAA decreasing as the levels of CGM in the diets increased. With the exception of Lys and Arg, the availability of essential amino acids dropped to 30% after replacing 100% of the FM (Table 6). When studying white shrimp feed, Yang et al. (2009) reported that CGM resulted in a lower ADAA than most other protein sources (including soy bean, peanut, wheat gluten, shrimp by-products and FM). CGM ADAA levels were similar only to bone meat and poultry meals. The higher availability of Arg and Lys observed in the current study demonstrates that *L. vannamei* are capable of effectively utilizing these two amino acids.

**Table 6. Amino acids apparent digestibility coefficients of white shrimp, *L. vannamei* fed the experimental diets containing different replacements levels of fishmeal by corn gluten meal.**

DIET	CGM0	CGM25	CGM50	CGM75	CGM100	SEM
Arginine	87.13 <sup>a</sup>	78.52 <sup>b</sup>	66.14 <sup>c</sup>	68.66 <sup>bc</sup>	71.29 <sup>bc</sup>	2.45
Histidine	81.64 <sup>a</sup>	60.88 <sup>b</sup>	49.32 <sup>b</sup>	48.12 <sup>b</sup>	48.61 <sup>b</sup>	4.51
Isoleucine	85.77 <sup>a</sup>	77.25 <sup>b</sup>	59.11 <sup>c</sup>	55.82 <sup>c</sup>	55.17 <sup>c</sup>	3.51
Leucine	86.99 <sup>a</sup>	70.25 <sup>b</sup>	64.13 <sup>b</sup>	59.26 <sup>b</sup>	57.39 <sup>b</sup>	6.35
Lysine	90.83	87.80	85.01	87.25	84.40	1.44
Methionine	87.87 <sup>a</sup>	76.23 <sup>b</sup>	62.10 <sup>cd</sup>	54.23 <sup>d</sup>	57.88 <sup>d</sup>	3.71
Phenylalanine	77.48 <sup>a</sup>	54.97 <sup>b</sup>	40.10 <sup>c</sup>	38.93 <sup>c</sup>	36.86 <sup>c</sup>	5.26
Threonine	83.29 <sup>a</sup>	70.05 <sup>b</sup>	59.00 <sup>c</sup>	50.19 <sup>d</sup>	49.01 <sup>d</sup>	3.63
Valine	85.29 <sup>a</sup>	73.87 <sup>b</sup>	60.74 <sup>c</sup>	55.37 <sup>cd</sup>	51.26 <sup>d</sup>	3.71
Sum of EAA	85.14	72.20	60.63	57.54	56.87	
Alanine	85.15 <sup>a</sup>	63.89 <sup>b</sup>	60.90 <sup>b</sup>	58.94 <sup>b</sup>	56.52 <sup>b</sup>	3.32
Aspartic acid	85.22 <sup>a</sup>	72.63 <sup>b</sup>	61.76 <sup>cd</sup>	59.10 <sup>d</sup>	58.56 <sup>d</sup>	2.95
Glutamic acid	90.11 <sup>a</sup>	73.74 <sup>b</sup>	70.94 <sup>bc</sup>	69.02 <sup>c</sup>	67.01 <sup>c</sup>	2.39
Glycine	80.28 <sup>a</sup>	72.55 <sup>a</sup>	74.40 <sup>a</sup>	77.19 <sup>a</sup>	72.31 <sup>a</sup>	1.59
Proline	88.40 <sup>a</sup>	75.81 <sup>a</sup>	50.76 <sup>bc</sup>	49.83 <sup>c</sup>	49.08 <sup>c</sup>	5.44
Serine	83.28 <sup>a</sup>	66.21 <sup>b</sup>	52.09 <sup>c</sup>	51.52 <sup>cd</sup>	50.20 <sup>cd</sup>	3.63
Sum of NEAA	85.40	70.81	61.81	60.93	58.95	

Mean of six replicates using initial weight as covariate

SME = Standard Error of Mean

EAA = Essential amino acids

NEAA= Non Essential amino acids

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

The reduction in the digestibility of amino acids in line with the incorporation of plant proteins such as rice protein concentrate (RPC) has been reported by

Oujifard et al. (2012), mainly in Arg (42%). The digestibility of Lys and Met however remained relatively high with the maximum level of RPC and without FM, disagreeing therefore with the present results.

A potential deficiency in essential amino acids, in particular Lys and Met, may be responsible for the depressed growth of shrimp fed CGM replacement diets. The previous dietary Lys requirement for *L. vannamei* was 4.5% protein (Fox 1995), although Xie et al. (2012) reported slightly higher needs, around 4.9 % protein. CGM0, which provided 5.4% protein, would be the only diet able to meet these needs, as the others contained lower levels (1.8-4.3%). If digestible Lys is taken into account, the availability of Lys is reduced; although the level of 4.9% in diet CGM0 would cover the requirement, the situation worsens in the rest of diets, 1.5-3.8%.

The Met content (% of dietary protein) of the CGM replacement diet decreased to 2.0% in CGM25 and CGM50 and 1.7-1.8% in CGM 75 and CGM100, compared with 2.5% in diet CGM0 (0% replacement). All of these levels would be considered lower than the recommended level for shrimp diets of around 2.5% (Akiyama et al. 1992). When we consider the re-evaluation of the requirements, made by Fox et al. (2006, 2011), to 1.14% protein, all of the CGM diets would cover the Lys requirements. However, if we consider the digestibility of Met, the requirements would only be covered by diets CGM0 (2.10%), CGM25 (1.52%) and CGM50 (1.24%), but not by CGM75 or CGM100 (0.98%).

It is therefore reasonable to say that including CGM would also have a negative effect on weight gain due to the combined deficiency of Lys and Met, mainly influenced by Lys and to a lesser degree by Met. Thus the optimal supplementation of both Lys and Met must be considered in future studies on shrimp.

There were significant differences in the FCR between the dietary treatments. The inclusion of CGM up to a level of 8.6% had a negative effect, but similar FCRs were observed in the CGM25 diet and in the CGM0 diet. The FCR of these two diets was higher than those cited by some authors (Lim et al. 1997; Davis & Arnold, 2000; Amaya et al., 2007b; Bauer et al., 2012), but similar to



those reported by others with varying ingredients (Davis et al., 2002; Molina-Poveda & Morales 2004; Nunes et al. 2011; Molina-Poveda et al. 2013).

The differences in survival were not significant and no relationship with the diets could be observed, with most instances of mortality being the result of shrimp jumping out of the tanks. No gross pathological signs were observed in juveniles fed CGM diets. Anecdotal evidence from feed manufacturers suggests that high incorporation levels of dietary CGM or other corn products may negatively affect flesh pigmentation in fish, but there were no visible differences in the coloration of the exoskeleton or muscle of the shrimp fed diets with or without corn gluten feed. The CGM xanthophyll concentration used in the present study was 250 mg/kg which should result in 21.6, 43.2, 64.8 and 86.4 mg Xanthophyll/kg for diets. Levels such as these should not cause a discernible accumulation of yellow coloration in juvenile shrimps.

In general, the protein quality of the dietary ingredients is the most important factor affecting shrimp performance, and protein digestibility is the first measure of its availability by shrimp. The protein quality of dietary protein sources depends on the amino acid composition and digestibility. The results of this study suggest that the protein digestibility coefficients of the CGM diets are indicative of an average amino acid digestibility. However, because of the variation in the availability of individual amino acids in the feeds tested, the use of specific amino acid digestibility coefficients may provide more accurate and economical feed formulations.

A cost-benefit analysis of shrimp production was not made in this study, but the inclusion of CGM results in a reduction in diet price of 53, 107, 160 and 213 US\$ ton<sup>-1</sup> respectively for the 25, 50, 75 and 100 diets, and if we take into consideration the FCR, diets CGM0 and CGM25 would display the best economic conversion ratio (ECR).

## **5. Conclusion**

In summary, reduced palatability, low protein digestibility and a deficiency of Lys and Met seem to be the major reasons behind a depressed growth in shrimp fed CGM protein-based diets. Most of the changes observed in the parameters

are the cause rather than the consequence of the changes in growth performance. Nevertheless, this is the first report published on FM replacement by CGM for *L. vannamei* and hence provides useful information about the assessment of CGM in shrimp diet formulations.

Therefore, further studies are needed to fully explore feeding regulations and the nutritive value of CGM protein feedstuffs in *L. vannamei* diets.

### **Acknowledgements**

This work was partially funded by a grant from the International foundation for Science (A/330). The authors would like to extend their thanks to staff at CENAIM for their support during this study. The English version of the manuscript was revised by Anna Sinclair.

### **References**

Akiyama, D. M., Dominy, W. G. & Lawrence, A. L. (1992) Penaeid Shrimp Nutrition. In Marine Shrimp Culture: principles and practices (Fast, A.W. & Lester, L.J. eds.), pp. 535-568. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, USA.

Amaya, E.A., Davis, D.E. & Rouse; D.B. (2007a) Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*, **262**, 393-401.

Amaya, E.A., Davis, D.E. & Rouse; D.B. (2007b) Alternative diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, **262**, 419-425.

Antoine, F.R., Wei, C.I., Littell, R.C. & Marshall, M.R. (1999) HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5100–5107.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990) Official Methods of Analysis, 15th edn., 1298pp. AOAC, Arlington, VA, USA.

Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Borges, M., Wasielesky Jr., W. & Poerch, L.H.S. (2012) Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **342-343**, 112-116.

Brand, C. & Colvin, L. (1977) Compounded diets for early postlarval *Penaeus californiensis*. *Proc. World Maric. Soc.*, **8**, 811-820.

Cruz-Suárez, L. E., Nieto-López, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U. & Ricque-Marie, D. (2007) Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture*, **272**, 466-476.

Davis D.A. & Arnold C.R. (2000) Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **185**, 291-298.

Davis D.A., Arnold C.R., McCallum, I. (2002) Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.*, **8**, 87-94.

Davis D.A., Samocha, T.M., Bullis, R.A., Patnaik, S., Browdy, C.L., Stokes, A.D. & Atwood, H. (2004) Practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): Working towards organic and/or all plant production diets. In *Avances en Nutrición Acuícola VII* (Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villareal, D., Scholz, U. & González, M. eds), 202-214. *Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16-19 November 2004. Hermosillo, Sonora. México.

Espinoza, M. (2013) Digestibilidad *in vitro* de diferentes fuentes proteicas usando enzimas específicas de *Litopenaeus vannamei*. Master thesis. Polytechnic University of Valencia. 22 pp.

FAO (2012) The state of the world fisheries and aquaculture 2012 FAO, Rome (2012) Available at <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf> Accessed 13.10.12

Forster, I., Dominy, W. & Tacon, A.G. (2002) The use of concentrates and other soy products in shrimp feeds. In *Avances en Nutrición Acuícola VI* (Cruz-

Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Gaxiola-Cortes, M.G. & Simoes, N. eds.), pp. 527-540. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. 3-6 September 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Forster, I.P., Dominy, W., Obaldo, L. & Tacon, A.G.J. (2003) Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, **219**, 655–670.

Foster J.R. & Gabbot P.A. (1971) The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **51**, 943-961.

Fox, J. M., Lawrence, A. L. & Li-Chan, E. (1995) Dietary requirements for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture*, **131**, 279-290.

Fox, J.M., Davis, D.A., Wilson, M. & Lawrence, A.L. (2006) Current status of amino acid requirement research with marine penaeid shrimp. In *Avances en Nutrición Acuícola VIII* (Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-Lopez, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Puello-Cruz, A.C., Garcia-Ortega, A., eds.), pp. 182–196. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15-17 November 2006. Monterrey, Nuevo León, México.

Fox, J. M., Humes, M., Davis, D.A. & Lawrence, A. (2011) Evaluation of methionine supplements and their use in grain-based feeds for *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **42**, 676-686.

Gaylord, T.G., Barrows, F.T. & Rawles, S.D. (2010) Apparent amino acid availability from feedstuffs in extruded diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacul. Nutr.*, **16**, 400–406.

Hanel, R., Broekman, D., de Graaf, S. & Schnack, D. (2007) Partial replacement of fishmeal by liophylized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in Pacific white shrimp diets. *Open Mar. Biol. J.*, **1**, 1-5.

Harter, T., Buhrke, F., Kumar V., Focken, U., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2011) Substitution of fish meal by *Jatrofa curcas* kernel meal: Effects on growth

performance and body composition of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquacul. Nutr.*, **17**, 542-548.

Hernández, C., Olvera-Novoa, M.A., Aguilar-Vejar, K., González-Rodríguez, B. & Abdo de la Parra, I. (2008) Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, **277**, 244-250.

Hernández, C., Olvera-Novoa, M.A., Smith, D.M., Hardy, R.W. & González-Rodríguez, B. (2011) Enhancement of shrimp *Litopenaeus vannamei* diets based on terrestrial protein sources via the inclusion of tuna by-products protein hydrolysates. *Aquaculture*, **317**, 117-123.

Ju, Z.Y., Forster, I.P. & Dominy, W.G. (2009) Effect of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulate diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, **292**, 237-234.

Lemos, D., Lawrence, A.L. & Siccardi, A.J. (2009) Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by in vitro pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **295**, 89-98.

Lim C. & Dominy W. (1990) Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, **87**, 53-63.

Lim C. & Dominy W. (1992) Substitution of full-fat soybeans for commercial soybean meal in diets for shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Appl. Aquacult.*, **3**, 35-45.

Lim, C. (1996) Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **27**, 402-409.

Lim, C., Beames, R.M., Eales, J.G., Prendergast, A.F., Mclesse, J.M., Shearer, K.D. & Higgs, D.A. (1997) Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture Res.*, **3**, 269-279.

- Lorico-Querijero, B. V. & Chiu, Y. N. (1989) Protein digestibility studies in *Oreochromis niloticus* using chromic oxide indicator. *Asian Fish. Sci.*, **2**, 177-191.
- Markey, J.C., Amaya, E.A. & Davis, D.A. (2010) Replacement of Poultry By-product Meal in Production Diets for the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **41**, 893-902.
- Martínez-Rocha, L., Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D. & Cruz-Suárez, L.E. (2012) Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquaculture Res.*, **44**, 847-859.
- Masumoto, T., Ruchimat, T., Ito, Y., Hosokawa, H. & Shimeno, S. (1996) Amino acid availability values for several protein sources for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, **146**, 109-119.
- McGinnis, A.J. & Kasting, R. (1964) Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 259-262.
- Molina-Poveda, C. & Morales, M.E. (2004) Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Res.*, **35**, 1158–1165.
- Molina-Poveda, C., Lucas, M. & Jover, M. (2013) Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. *Aquaculture*, **410-411**, 148-156.
- Morales, A. E., Cardenete, G., De la Higuera, M. & Sanz, A. (1994) Effect of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **124**, 117-126.
- Moyano, F.J., Cardenete, G. & De La Higuera, M. (1991) Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **100**, 759–762.

Naylor, R., Goldberg, R., Primavera, J., Kautsky, N., Beveridge, C. M., Clay, J., Folkes, C., Lubchenco, J., Mooney, H. & Troell, M. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* **405**, 1017-1024.

Nunes, A.J.P., Sá, M.V.C. & Sabry-Neto, J. (2011) Growth performance of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed on practical diets with increasing levels of the Antarctic krill meal, *Euphasia superba*, reared in clear- versus green-water culture tanks. *Aquacul. Nutr.*, **17**, e511-e520.

Oujifard, A, Seyfabadi, J., Kenari, A.A. & Rezaei, M. (2012) Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish meal. *Aquaculture*, **342-343**, 56-61.

Pereira, T.G. & Oliva-Teles, A. (2003) Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Res.*, **34**, 1111–1117.

Pongmaneerat, J. & Watanabe T. (1992) Utilization of soybean meal as protein insource in diets for rainbow trout. *Nippon Suisan Gakk.*, **58**, 1983-1990

Pontecorvo, G. (2001) Supply side uncertainty and the management of commercial fisheries: Peruvian Anchovetta, an illustration. *Mar. Policy*, **25**, 169-172.

Regost, C. J. Arzel & Kaushik, S.J. (1999) Partial or replacement of fish meal by corn gluten meal (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, **180**, 99-117

Richard, L., Surget, A., Rogolet, V., Kaushik, S. & Geurden, I. (2011) Availability of essential amino acids, nutrient utilization and growth in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following fishmeal replacement by plant protein. *Aquaculture*, **322-323**, 109-116.

Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M. & Montero D. (1997) Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Spurus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, **157**, 347-359.

Sá, M.V.C., Sabry-Nieto, H., Cordeiro-Junier, E. & Nunes, A.J.P. (2012) Dietary concentration of marine oil affect replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacul. Nutr.*, **19**, 199-210.

Shimeno, S., Masumoto, T., Hujita, T., Mima, T. & Ueno, S. (1993) Alternative protein sources for fish meal in diets of young yellowtail. *Nippon Suisan Gakk.*, **59**, 137-143 (in Japanese with English abstract).

Smith, D.M., Tabrett, S.J., Irvin, S.J. & Barclay, M. (2000) Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia In *Avances en Nutricion Acuicola V* (Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, Olvera-Novoa, M.A. & Civera-Cerecedo, R., eds.), pp 277-286. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatan, Mexico,

Sookyin, D. & Davis, D.A. (2011) Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture*, **319**, 141-149.

Suárez, J.A., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., Suárez, A., Faillace, J. & Cuzonc, G. (2009) Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, **289**, 118-123.

Sudaryono, A., Hoxey, M., Kailis, S. & Evans, L.H. (1995) Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, **134**, 313-323.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E. & Evans, L.H. (1999) Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquacult. Nutr.*, **5**, 277-285.

Tacon, A.G.J. & Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**, 146-158.



Tibbetts, S.M., Milley, J.E. & Lall, S.P. (2006) Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, **261**, 1314–1327.

Wu, Y.V., Rosati, R.R., Sessa, D.J. & Brown, P.B. (1995) Evaluation of corn gluten meal as a protein source in tilapia diets. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1585-1588.

Wu, Y.V., Rosati, R.R. & Brown, P.B. (1998) Effects of lysine on growth of tilapia fed diets rich in corn gluten meal. *Cereal Chem.*, **75**, 771-774.

Wu, Y.V., Tudor, K.W., Brown, P.B. & Rosati, R.R. (2000) Growth response of tilapia fed diets rich in high-lysine corn and corn gluten. *J. of Aquat. Food Prod. T.*, **9**, 19-27.

Xie, F., Zeng, W., Zhou, Q., Wang, H., Wang, T., Zheng, C. & Wang, Y. (2012) Dietary lysine requirements of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **358-359**, 116-121.

Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Chi, S. & Dong, X. (2009) Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture Res.*, **41**, 78-86.

Ye, J.D., Wang, K., Li, F.D, Sun, I.Z. & Liu, X.H. (2011) Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein level. *Aquacul. Nutr.*, **17**, 337-347.

Ye, J.D., Liu, X.H., Kong, J.H., Wang, K., Sun, I.Z, Zhang, C.X., Zhai, S.W. & Song, K. (2012) The evaluation of practical diets on a basis of digestible crude protein, lysine and methionine for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacul. Nutr.*, **18**, 651-661.

Zar J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 663pp.

**Aquaculture Nutrition 2014, 21: 824-834**

### 3.3 Evaluation of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) protein sources as partial substitutes for fish meal in *Litopenaeus vannamei* grow-out diets.

César Molina-Poveda<sup>1</sup>, Ricardo Cárdenas<sup>1</sup>, Miguel Jover<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENAIM-ESPOL. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Campus Gustavo Galindo. Km. 30.5 Vía perimetral. P.O. Box 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. E-mail: [cmolinapoveda@gmail.com](mailto:cmolinapoveda@gmail.com)

<sup>2</sup> Biodiversity and Aquaculture Group. Institute of Animal Science and Technology. Universitat Politècnica de Valencia. Camino de Vera, s/n. 46071 Valencia (Spain). E-mail: [mjover@dca.upv.es](mailto:mjover@dca.upv.es)

**Corresponding author:** Cesar Molina-Poveda. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Campus Gustavo Galindo. Km. 30.5 Vía perimetral. P.O. Box. 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. (Actually in GISIS. km 6.5 vía Duran – Tambo. P.O. Box 09-12-4678. Guayaquil, Ecuador). E-mail: [cmolinapoveda@gmail.com](mailto:cmolinapoveda@gmail.com)

#### Abstract

Two groups of isonitrogenous diets formulated by replacing 15, 25, 35 and 45% of fish meal protein by amaranth meal and quinoa meal were used to evaluate the performance of *Litopenaeus vannamei*.

Growth showed significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the group of shrimp fed with amaranth diets, with diet A15 showing the best specific growth rate (SGR =  $2.81\% \text{ d}^{-1}$ ), but after the control diet AQ0 ( $3.07\% \text{ d}^{-1}$ ). Diet A15 had significantly ( $p < 0.05$ ) the best digestibility of dry matter (79.7%) and protein (88.4 %) without differences compared to control diet AQ0 (75.1% and 85.2%). Replacement with quinoa meal at any level tested did not significantly affect ( $p > 0.05$ ) the shrimp growth performance. Shrimp fed with quinoa diets showed better SGR ( $3.05\% \text{ d}^{-1}$ ) than those shrimp fed amaranth ( $2.56\% \text{ d}^{-1}$ ). No differences in feed conversion ratio appeared in either of the protein sources, but quinoa diets presented a better average (3.13) than amaranth diets (4.01). The apparent digestibility of dry matter and protein for quinoa diets was similar for all diets,

but they were statistically different ( $p < 0.05$ ) from the control diet. We conclude that quinoa meal can replace fishmeal up to 45%, whereas it can be replaced with amaranth meal up to 15%, without adverse effects on growth and survival.

**Keywords:** Plant protein; shrimp growth; digestibility; fishmeal replacement.

## 1. Introduction

Efficient production of aquatic species in intensive and semi-intensive production systems requires the use of commercial feed as a primary or supplementary source of nutrients, respectively. Fishmeal is an animal protein source commonly used in feeds for aquatic animal and it is the main ingredient in commercially manufactured feeds due to its high palatability and good nutritional balance (Sudaryono, Tsvetnenko & Evans 1999). Inclusion levels of fishmeal in commercial diets vary from 100 to 500 g kg<sup>-1</sup> (Tacon & Metian 2008). This reliance on the use of fishmeal as the main protein component in formulated diets is a factor that significantly affects operating costs of shrimp farming. In contrast to the production of fishmeal, aquaculture is in constant growth, so other protein sources will have to be identified and evaluated for use in feeds for fish and shrimp.

Commercial shrimp feeds contain 300-500 g kg<sup>-1</sup> crude protein, which comes mainly from animal products such as marine fish, shrimp and squid (Mente, Coutteau, Houlihan, Davidson & Sorgeloos 2002). The need to seek new protein sources, through evaluation of plant or animal ingredients in terms of growth response and nutrients digestibility in order to incorporate them into feeding of different shrimp species (Shiau 2008; Venero, Davis & Lim 2008), is a long-standing issue. It is clear that most attention has been focused on studies of soybean meal as a substitute for animal protein (Dersjant-Li 2002) due to its nutritional quality, low cost and constant availability (Mbahinzireki, Dabrowski, Lee, El-Saidy & Wisner 2001). An earlier work showed that soybean meal could effectively replace up to 42% of fish meal protein in feeds for *L. vannamei* (Lim & Dominy 1990, 1992), but when soybean was co-extruded with poultry by-products, it can replace up to 80% of fish meal without having

adverse effect on survival and feed conversion (Davis & Arnold 2000). Many researchers have tried to replace the expensive fish meal as ingredient in feeds for shrimp *L. vannamei* feed with other available protein sources such as cottonseed (Lim 1996), canola meal (Lim, Beames, Eales, Prendergast, Mclesse, Shearer & Higgs 1997), pea meal (Davis, Arnold & McCallum 2002; Martínez-Rocha, Gamboa-Delgado, Nieto-López, Ricque-Marie & Cruz-Suarez 2012), barley-based fermented grains (Molina-Poveda & Morales 2004), a mixture of plant and poultry by-products (Amaya, Davis & Rouse 2007a, 2007b), algae (Hanel, Broekman, de Graaf & Schnack 2007; Ju, Forster & Dominy 2009), a mixture of plant protein soybean, canola and milo (sorghum) (Suárez, Gaxiola, Mendoza, Cadavid, Garcia, Alanis, Suárez, Faillace & Cuzon, 2009; Sookying & Davis 2011), Jatropha kernel meal (Harter, Buhrke, Kumar, Focken, Makkar & Becker 2011), a mixture of meat, poultry, blood and corn gluten meal (Ye, Wang, Li, Sun & Liu 2011; Ye, Liu, Kong, Wang, Sun, Zhang, Zhai & Song 2012), soy protein concentrate (Sá, Sabry-Nieto, Cordeiro-Junier & Nunes 2012; Bauer, Prentice-Hernandez, Borges, Wasielesky Jr. & Poerch 2012), rice protein concentrate (Oujifard, Seyfabadi, Kenari & Rezaei 2012), lupin meal (Molina-Poveda, Lucas & Jover 2013) and corn gluten meal (Molina-Poveda, Lucas & Jover 2014).

Among other plant species with high nutritional value is *Amaranthus* spp., which is widely cultivated in Ecuador as a minor fodder crop in the highlands. The most common amaranth seed contain 145–160 g kg<sup>-1</sup> crude protein (Table 1), about twice that of cereal grains, and also has a high lysine content which makes it particularly attractive to increase the biological value of processed feeds (Pedersen, Hallgren, Hansen & Eggum 1987a). As for carbohydrates, the seed contains 580-680 g kg<sup>-1</sup> starch, about 200 g kg<sup>-1</sup> amylose and 50 g kg<sup>-1</sup> sugar. Starch granules are extremely small (1 to 3 $\mu$ ) and gelatinized at 55-65 °C giving unique gelatinization characteristics which may be of benefit for the food industry (Lehman 1988).

**Table 1. Proximate composition (g kg<sup>-1</sup>) of ingredients and Amino acid profile (g kg<sup>-1</sup> protein) of amaranth, quinoa and fish meal used in feed formulation on dry matter basis.**

	Amaranth	Quinoa	Fishmeal
Moisture	38.3	95.9	64.6
Crude protein (Nx6.25)	174.7	154.4	703.0
Crude lipid	64.9	83.4	120.5
Crude Fibber	13.8	9.1	
Ash	28.2	25.3	117.5
Calcium	0.9	0.6	19.6
Phosphorous	7.4	7.3	19.4
Energy (MJ/Kg)	200.4*	201.2*	203.8
<b>Amino acids</b>			
Arginine	100.0	74.0	54.7
Histidine	25.0	46.0	24.6
Isoleucine	37.0	70.0	36.9
Leucine	57.0	73.0	73.8
Lysine	80.0	84.0	80.7
Methionine	42.0	55.0	30.1
Phenylalanine	77.0	53.0	39.6
Threonine	36.0	57.0	43.7
Valine	43.0	76.0	47.8

\*Peralta, Mazón, Murillo, Villacrés, Rivera & Subia (2009)

There are a few reports on the use of amaranthus in aquafeeds. Virk & Saxena (2003) studied amaranthus seeds as replacement for rice bran and groundnut oil cake at three different levels (20%, 35%, 50%) in diets for common carp, *Cyprinus carpio*, and rohu, *Labeo rohita*, under a semi-intensive production system. Growth in terms of body weight gain was maximum in fish fed on diets containing 200 g kg<sup>-1</sup> amaranthus seeds. Overall, the fish fed on diets containing amaranthus seeds at different levels showed better growth than the control. Adewolu & Adamson (2011) evaluated amaranthus leaf meal as dietary protein source in diets for *Clarias gariepinus*. *Amaranthus spinosus* leaf meal was included in the diets at 0, 50, 100, 150 and 200 g kg<sup>-1</sup> and delivered to fingerlings of 5g for 56 days. The results indicated that up to 50 g kg<sup>-1</sup> *A. spinosus* leaf meal could be included in practical diets for *C. gariepinus* without affecting growth and feed utilization.

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) is an ancient agricultural species originated from South America that has been cultivated as a protein source in human nutrition for 7000 years (Jacobsen 2003). Quinoa production has increased in the last 40 years. The main producing countries are Bolivia, Peru, and Ecuador, which in 2011 produced 80,255 tons, from 17,747 tons in 1971 (FAOSTAT 2011). During 2011 quinoa production was 41,182 tons in Peru, 38,257 tons in Bolivia, and 816 tons in Ecuador (FAOSTAT 2011).

Quinoa is an annual plant that grows in the Andean regions in a wide range of extraordinary “*altiplano*” conditions (FAO 2011). The grain is small, and typically has a protein content of 140 to 180 g kg<sup>-1</sup>, as compared to 100 to 120 g kg<sup>-1</sup> for major cereals. Quinoa is particular rich in amino acids which are scarce in other cereals (FAO 2011), possessing higher proportions of lysine and the sulphur-containing amino acids, cysteine and methionine.

As in amaranth, the starch is mainly located in the perisperm and occurs at 60% in quinoa as compound granules of average particle size of 0.8-1.5 µm in different native varieties of Ecuador, having an amylose content of less than 110 g kg<sup>-1</sup> (Koziol 1992). Triterpenoid saponins have been detected in quinoa and considered to be toxic to fish, limiting the inclusion levels of several alternate plant protein sources in diets for fish (Francis, Makkar & Becker 2001).

Quinoa is also a source of a wide range of vitamins and minerals and is particularly high in iron (Repo-Carrasco, España & Jacobsen 2001). In a digestibility study on tilapia reported by Gutiérrez-Espinosa, Yossa-Perdomo & Vásquez-Torres (2011), these authors working with tilapia nilotica found that the dry matter, protein and energy apparent digestibility coefficients were respectively 58.8-64.4 %, 67.7-77.5% and 29.0-66.1%, similar to other cereals.

The aim of this study was to determine if fishmeal can be replaced by other protein sources such as amaranth and quinoa in experimental diets for juveniles of the shrimp *Litopenaeus vannamei*, while maintaining the dietary protein and lipid content constant. The diets were evaluated in aquaria under controlled conditions in terms of digestibility, ingestion, growth and survival rates of shrimps.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Quinoa saponin removal**

The seeds of quinoa *C. quinoa* were rinsed in clean water three times, thereby withdrawing the shell and therefore the saponins, which constitute an anti-nutritional factor. The seeds were then drained and left to dry in an oven for 24 hours at 60 °C. Like other ingredients, quinoa and amaranth were pulverized to 300  $\mu\text{m}$ .

### **2.2. Experimental diets**

Two sets of experimental diets were prepared with a level of 300 g kg<sup>-1</sup> crude protein, including a control diet, in which fish meal was replaced by vegetable protein 150, 250, 350 and 450 g kg<sup>-1</sup> protein, the first group by amaranth meal and the second one by quinoa meal. Additionally, a commercial diet (326 g kg<sup>-1</sup> protein and 72 g kg<sup>-1</sup> lipid) was tested.

**Table 2. Ingredient levels and proximate composition (g kg<sup>-1</sup>) of the diets (AQ0= basal diet; A= amaranth; Q= quinoa; 0-45 represent the protein level from fish meal replaced by protein from either A or Q).**

Ingredients	AQ0	A15	A25	A35	A45	Q15	Q25	Q35	Q45
Fish meal <sup>1</sup>	315.6	268.3	236.7	205.2	173.6	268.3	236.7	205.2	173.6
Amaranth <sup>2</sup>	0.0	184.5	307.5	430.4	553.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Quinoa <sup>3</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	208.5	347.4	486.4	625.4
Squid meal <sup>4</sup>	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Wheat gluten <sup>5</sup>	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Fish oil	34.8	28.4	24.2	20.0	15.8	23.5	16.0	08.4	0.9
Soybean Lecithin	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cholesterol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamins premix <sup>6</sup>	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Minerals premix <sup>7</sup>	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Carboxymethyl cellulose	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Antioxidant	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Mould inhibitor	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Chromic oxide	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Corn starch <sup>8</sup>	450.9	320.1	232.9	145.7	58.5	301.1	201.2	101.3	1.4
	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Proximate composition (g kg<sup>-1</sup> as dry matter)</b>									
Moisture (as was at mixing)	58.2	68.0	66.3	110.9	109.1	59.9	60.2	80.3	114.2
Crude protein (Nx6.25)	308.9	301.7	293.1	289.3	288.3	308.7	303.7	302.7	302.9
Crude fat	62.4	71.6	69.0	71.0	68.3	76.4	66.7	62.5	62.9
Carbohydrate <sup>9</sup>	499.1	487.3	501.2	462.2	467.4	483.0	500.5	488.5	455.7
Ash	71.4	71.4	70.4	66.6	66.9	72.0	68.9	66.0	64.3
Energy (MJ/kg dry matter) <sup>10</sup>	168.0	168.0	167.0	161.0	160.0	170.0	168.0	165.0	160.0

<sup>1</sup>Produced by steam dry method. Polar, Salango, Ecuador.

<sup>2</sup>INIAP Alegría variety, provided by Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quito, Ecuador

<sup>3</sup>INIAP Tunkahuan variety, provide by INIAP. Quito, Ecuador

<sup>4</sup>Processed in the laboratory by lyophilized from commercial frozen baby squid *Loligo* sp (71.2% crude protein c.p.; 7.5% lipid)

<sup>5</sup>Purchase from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA (88.6% c.p.; 0.6% lipid)

<sup>6</sup>(mg 100g<sup>-1</sup> diet): p-amino benzoic acid, 10; thiamin-HCl, 12; riboflavin, 20; pyridoxine-HCl, 12; choline chloride, 250; nicotinic acid, 75; calcium pantothenate, 50; inositol, 200; biotin, 0.5; folic acid, 1.5; ascorbic acid, 10; menadione, 4; α-tocopherol acetate, 40; cyanocolabamine, 0.03; cholecalciferol, 0.03; β-carotene, 1.15 10<sup>-3</sup>.



<sup>7</sup>(mg 100g<sup>-1</sup> diet): calcium phosphate monobasic, 272; calcium lactate, 640.2; ferric citrate, 60; magnesium sulphate heptahydrate, 274; potassium phosphate, 480; sodium phosphate monobasic, 174; sodium chloride, 86; aluminium chloride, 0.4; potassium iodide, 0.3; cuprous chloride, 0.2; manganese sulphate monohydrate, 1.6; cobalt chloride hexahydrate, 2.1; zinc sulphate heptahydrate, 7.1; sodium selenite, 2.

<sup>8</sup>Purchase from Sumesa S.A., Guayaquil, Ecuador

<sup>9</sup>Calculated value: carbohydrate=total-(ash+crude protein+moisture+total lipid).

<sup>10</sup>Total energy was calculated using following factors: 23 kJ/g protein; 35 kJ/g lipid; 15 kJ/g carbohydrate

**Table 3. Analysed essential amino acid profile of the experimental diets expressed as g kg<sup>-1</sup> protein and g kg<sup>-1</sup> diet between brackets.**

	<b>AQ-00</b>	<b>A-15</b>	<b>A-25</b>	<b>A-35</b>	<b>A-45</b>	<b>Q-15</b>	<b>Q-25</b>	<b>Q-35</b>	<b>Q-45</b>
Arginine	60.5 (18.7)	66.1 (19.9)	69.9 (20.5)	73.5 (21.3)	77.3 (22.3)	62.9 (19.4)	64.5 (19.6)	66.2 (20.0)	67.8 (20.5)
Phenylalanine	41.5 (12.8)	43.2 (13.0)	44.1 (12.9)	45.4 (13.1)	47.1 (13.6)	43.7 (13.5)	45.3 (13.8)	46.8 (14.2)	48.4 (14.7)
Histidine	27.1 (8.4)	31.7 (9.6)	35.0 (10.3)	37.9 (11.0)	41.3 (11.9)	29.6 (9.1)	31.4 (9.5)	33.3 (10.1)	35.1 (10.5)
Isoleucine	44.5 (13.7)	44.2 (13.3)	44.1 (12.9)	44.1 (12.8)	43.7 (12.6)	44.8 (13.8)	44.9 (13.6)	44.8 (13.6)	45.0 (13.6)
Leucine	77.6 (24.0)	75.2 (22.7)	73.7 (21.6)	72.1 (20.9)	70.5 (20.3)	76.0 (23.5)	75.4 (22.9)	74.3 (22.5)	73.6 (22.3)
Lysine	75.2 (23.2)	72.5 (21.9)	70.6 (20.7)	68.7 (19.9)	67.0 (19.3)	72.3 (22.3)	70.3 (21.4)	68.2 (20.6)	66.5 (20.1)
Methionine	29.4 (9.1)	27.7 (8.4)	26.1 (7.6)	24.9 (7.2)	23.7 (6.8)	29.3 (9.0)	29.1 (8.8)	29.2 (8.8)	29.0 (8.8)
Threonine	42.8 (13.2)	46.2 (13.9)	48.6 (14.2)	50.9 (14.7)	53.3 (15.4)	44.1 (13.6)	44.9 (13.6)	45.8 (13.9)	46.7 (14.1)
Tryptophan	11.4 (3.5)	10.1 (3.0)	9.2 (2.7)	8.2 (2.4)	7.6 (2.2)	10.1 (3.1)	9.1 (2.8)	8.1 (2.5)	7.5 (2.3)
Valine	49.8 (15.4)	48.2 (14.5)	46.9 (13.7)	45.8 (13.2)	44.7 (12.9)	48.5 (15.0)	47.7 (14.5)	46.5 (14.1)	45.7 (13.8)
<b>Sum of EAA</b>	<b>459.7</b>	<b>465.2</b>	<b>468.3</b>	<b>471.5</b>	<b>476.1</b>	<b>461.3</b>	<b>462.7</b>	<b>463.2</b>	<b>465.2</b>

### 2.3. Palatability of diets

Acceptability was estimated based on the ingestion rate, determined over 6 days, for which two hours after each feeding, at 08:00 and 16:00 hours, the uneaten pellets (no faeces) were collected by siphoning in mesh of 300  $\mu\text{m}$  previously weighed. Meshes containing the pellets were placed in an oven at 60 °C for 24 hours and weighed again. A factor “F” was introduced to correct for feed losses due to water movement, aeration, siphoning and rinsing during the time that the feed was in the water. To determine this factor, 10 aquaria without shrimp were used where a known amount of feed was placed. The amount of feed consumed (dry matter) by shrimp was expressed as a percentage of the biomass of shrimp in the aquaria and used as an indicator of diet palatability by using the expressions:

$$\text{Palatability} = \frac{\text{Supplied feed} - (\text{Non consumed} \times F)}{\text{Biomass in aquarium}} \times 100$$

$$\text{Correction Factor (F)} = \frac{\text{Supplied feed}}{\text{Retrieved feed}}$$

### 2.4. Pellet water stability

For water stability of the diets, 2 g of pellets were weighed and placed in glass bottles (bottom area: 28.27  $\text{cm}^2$ ) with 100 ml of seawater (35g  $\text{L}^{-1}$ ). Samples in triplicate were placed in an EYELA horizontal shaker (Model NTS-1300, Japan) at 70 rpm and maintained in a water bath at 28 °C. After 2 hours of immersion, the pellets were collected in baskets with mesh size of 600  $\mu\text{m}$ , previously weighed and labelled. Meshes with the pellet were dried at 60 °C for 24 hours in an ISUZU oven (Model 2-2132, Japan) and after this period the weight recorded.

The retention rate of dry matter (PWS) was calculated using the formula:

$$PWS = 100 - \left( W_{\text{dry before immersion}} - W_{\text{dry after immersion}} \right) \times 100$$

## 2.5. Digestibility trial/evaluation of digestibility

At the end of the growth trial, shrimps were fed experimental diets containing 5g kg<sup>-1</sup> of chrome oxide. This compound is used as a reference component in feeds to determine relative digestibility of dry matter and protein. Chromic oxide is physiologically inert, non-toxic and can be easily mixed in formulated feeds. After a 7-day period of acclimation to the diets, faeces were collected 2 hours after each feeding and grouped by aquarium. Faecal material was gently rinsed with distilled water and stored in Eppendorf tubes at -80 °C. The faeces collected for 10 days were centrifuged, lyophilized and stored at -20 °C. Before analysis, dried faeces were ground to a fine and homogeneous powder in Eppendorf tubes with a metallic piston. Afterwards, the faeces powder was oven dried for 24h at 60°C and kept in a dry atmosphere using silica gel to ensure complete dryness at the time of weighing. Protein and chromic oxide contents of the diets and faeces were determined using a block digester after acid digestion (Foster & Gabbot 1971; McGinnis & Kasting 1964).

Correction from Ricque-Marie, Nieto-López, Tapia-Salazar, Guajardo-Barbosa, Villareal-Cavazos, Peña-Rodríguez & Cruz-Suárez (2008) was applied for calculations of apparent digestibility (AD) of protein and dry matter, using the following formula:

$$AD = \frac{\left( \frac{\% \text{ Nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3}{\% \text{ Nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3} \right)_{\text{faeces}}}{\left( \frac{\% \text{ Nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3}{\% \text{ Nutrient} / \% \text{ Cr}_2\text{O}_3} \right)_{\text{nutrient}}} \cdot \frac{1}{(1 - \% \text{ Losses} / 100)} \times 100$$

## 2.6. Growth trial at the laboratory

Juveniles of *Litopenaeus vannamei* (average weight 0.5g), originating from captive broodstock were obtained from facilities of Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) located in San Pedro de

Manglaralto, Province of Santa Elena, Ecuador. Seven shrimps were initially stocked ( $39 \text{ m}^{-2}$ ) in each of the 50 L polyethylene aquaria (60 cm length x 30 cm width x 36 cm height and bottom area  $0.18 \text{ m}^2$ , which were covered with 2 mm mesh netting to prevent the shrimps jumping out) with seawater, where they were acclimatized to the experimental conditions for a week and control diet prior to onset of the experiment. After this period of adaptation, shrimp were weighed and each shrimp lost was replaced by one of similar weight.

After the adaptation period, the growth trial started with shrimp having initial average weight of  $1.30 \pm 0.06\text{g}$ , which were fed *ad libitum* twice a day (12:00 and 18:00 h) for 8 weeks. Faeces, moults and excess feed were siphoned from aquariums before the first feeding. The shrimp in each aquarium were weighed biweekly and at the end of the trial. Mortalities were recorded during the study period

Water exchange in each aquarium was 300% daily with full-strength seawater (filtered and UV-treated) using a flow-through water system. A handheld oxygen meter WTW OXY3150i (Weilheim, Germany) was used to monitor the temperature and dissolved oxygen concentration of water in each aquarium daily and a refractometer was used to track salinity twice a week. The photoperiod was set at 12 hours light: 12 hours darkness.

## 2.7. Performance parameters

The growth parameter used to evaluate the quality of diets was calculated by the following equation:

$$\text{Specific growth rate (SGR; \% day}^{-1}\text{)} = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t(\text{days})} \cdot 100$$

Daily feed intake (DFI,  $\% \text{ d}^{-1}$ ) was calculated with corrected feed ingestion using the expression:

$$DFI = \frac{\text{Ingested feed/Averaged biomass}}{t(\text{days})} \cdot 100$$

Weight gain (%) = [(B<sub>f</sub> - B<sub>i</sub>) / B<sub>i</sub>] x 100

The feed conversion ratio (FCR) was estimated using the formula presented by Brand & Colvin (1977) for correcting dead shrimps:

$$FCR = \frac{\text{Ingested feed}}{B_f + \frac{W_i + W_f}{2} \cdot N_u - B_i}$$

Where B<sub>f</sub> = final biomass, B<sub>i</sub> = initial biomass, W<sub>i</sub> = average initial weight in each period, W<sub>f</sub> = average final weight in each period, N = number of dead shrimp in each period.

Protein efficiency ratio (PER) = wet weight gain (g)/protein consumed (g).

## 2.8. Analytical methods

Feed ingredients and diets were milled to fine powder (300 µm) and their proximate compositions were analysed using standard laboratory procedures (AOAC 1990). Dry matter was calculated from weight loss after drying in an oven at 105 °C for 2 h. Crude protein (Nx6.25) was measured using Kjeldahl method after acid digestion. Crude fat was calculated after extraction with diethyl ether extraction (Soxhlet technique). Ash was determined after ignition of the samples at 550 °C for 4 h in a muffle furnace. Amino acids were determined by high-performance liquid chromatography (Shimadzu, Japan) after hydrolysis of samples in 6 N HCl for 24 h at 110 °C. Then, samples were derivatized with o-phthalaldehyde (OPA) according to Antoine, Wei, Littell & Marshall (1999).

## 2.9. Statistical Analysis

All data are presented as the mean values (and SEM). The Anderson-Darling test was used to check for normality. Bartlett's test for homoscedasticity of variance was employed with P<0.05 (Zar 1999). One-way ANOVA considering initial weight as covariate and when pertinent, a posteriori Student-Newman-Keuls multiple comparison test, were used to determine significant difference

between treatments at a confidence level of 95%. The STATGRAPHICS statistical software package (Statistical Graphics System, Version Centurion, Herndon, V.A., USA) was used.

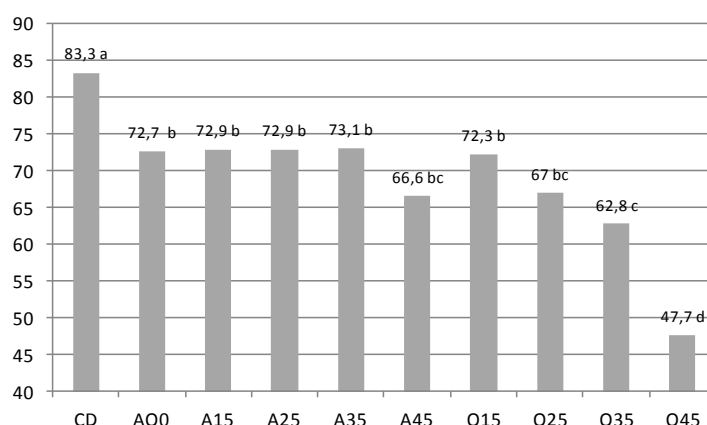
### 3. Results

#### 3.1 Water quality

Juveniles were reared in a system with a high seawater exchange rate of 300% per day. Dissolved oxygen, pH, temperature and salinity averaged  $5.43 \pm 0.63$  mg L<sup>-1</sup>,  $7.88 \pm 0.08$ ,  $25.5 \pm 1.33$  °C and 35 g L<sup>-1</sup>, respectively.

#### 3.2 Stability and palatability of experimental diet

The pellet water stability test shows (Fig. 1) that the diet with the highest amaranth inclusion level, A45, presented the highest ( $P < 0.05$ ) dry matter loss (33.4%). The rest of the diets containing amaranth (A15-A35) had similar values of stability to control diet, between 72.9 and 73.1%. After a 2-h immersion, the effect of quinoa content was more clearly established. Pellet stability progressively decreased as the quinoa content increased. Dry matter loss reached 52.3% where quinoa meal was included at a rate of 45% substitution (Q45). Commercial diet (CD) presented the highest stability.



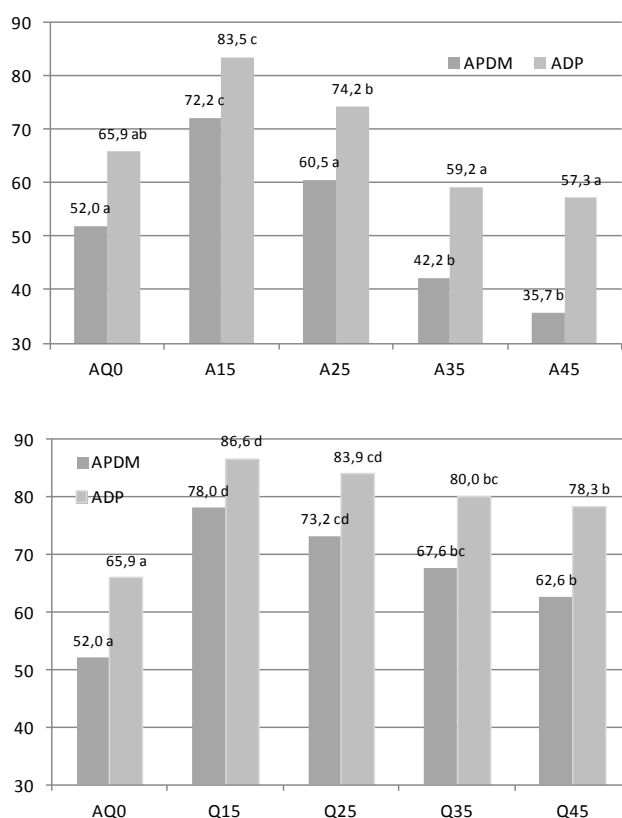
**Figure 1.** Dry matter pellet water stability (%) of diets containing different replacements levels of fishmeal by Amaranth and Quinoa (values with different superscripts are significantly different,  $P < 0.05$ ).

The palatability results in the laboratory trial revealed that all shrimp readily accepted the experimental diets and fed actively during this study, as no differences in palatability were obtained, ranging between 4.3 and 5.3 % day<sup>-1</sup>.

### 3.2 Apparent digestibility of protein (APD) and dry matter digestibility (ADMD)

Apparent digestibility coefficient, for both dry matter and protein, presented statistical differences (Fig. 2). Amaranth diet A15 had the highest values, but A35 and A45 presented significantly ( $P<0.05$ ) lowest ADMD and APD. The ADMD and APD in Quinoa diets were higher in Q15 and Q25 than control diet and Q45.

Meanwhile, both ADP and ADMD were statistically higher in diets with quinoa, 82.2% and 70.3%, than amaranth diets, 68.5% and 52.6% respectively.



**Figure 2.** Apparent dry matter (ADMD) and protein (APD) digestibility (%) of experimental diets containing different replacements levels of fishmeal by Amaranth and Quinoa (Values with different superscripts are significantly different,  $P<0.05$ )

### 3.3. Survival, growth, and feed performance

Few shrimps died during the 8-wk feeding trial, survival rate was not lower than 74% in diet A45, but no differences among treatments appeared (Tables 4 and 5).

**Table 4. Growth performance of white shrimp, *L. vannamei* reared for 8 weeks in 50-L indoor aquaria and fed the experimental diets containing different replacements levels of fishmeal by amaranth (*Amaranthus caudatus*)**

DIET	AQ0	A15	A25	A35	A45	SEM
Initial weight (g shrimp <sup>-1</sup> )	1.34	1.31	1.30	1.32	1.31	0.02
Final weight (g shrimp <sup>-1</sup> )	8.33 a	7.17 b	6.59 bc	5.45 c	5.41 c	0.39
SGR (% d <sup>-1</sup> )	3.07 a	2.81 a	2.68 ab	2.33 b	2.36 b	0.11
Survival (%)	94.3	93.1	91.0	83.4	74.4	7.38
Total weight gain (%)	538 a	446 b	402 bc	316 c	312 c	30.5
DFI (%BW day <sup>-1</sup> )	5.40	5.62	5.87	5.65	4.76	0.70
FCR	2.29	2.57	2.77	3.28	2.91	0.24
PER	1.31 a	1.20 ab	1.08 abc	0.84 bc	0.72 c	0.11

Mean of six replicates using initial weight as covariate

SEM = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ )

The one-way ANOVA revealed that the protein source exhibited an effect on growth (final weight, total weight gain and SGR) and PER in amaranth diets (Tables 4). SGR decreased related to inclusion amaranth in diets, from 3.07 in control diet AQ0 to 2.36 % day<sup>-1</sup> in diet A45, and also PER, from 1.31 to 0.72, respectively. No differences were found for feeding intake (DFI) and conversion ratio (FCR) related to the levels of ingredients.



No differences in growth appeared in quinoa diets, but a significant effect on DFI, FCR and PER was noted (Table 5), as diet Q45 showed the lowest value of these parameters compared to the other diets.

**Table 5. Growth performance of white shrimp, *L. vannamei* reared for 8 weeks in 50-L indoor aquaria and fed the experimental diets containing different replacements levels of fishmeal by quinoa (*Chenopodium quinoa*)**

DIET	AQ0	Q15	Q25	Q35	Q45	SEM
Initial weight (g/shrimp)	1.34 a	1.2 b	1.30 ab	1.32 ab	1.28 ab	0.02
Final weight (g/shrimp)	8.31	8.68	8.16	7.86	7.33	0.44
SGR (% d <sup>-1</sup> )	3.10	3.16	3.06	3.00	2.89	0.08
Survival (%)	92.4	90.5	94.3	88.8	93.4	4.48
Total weight gain (%)	551	561	534	512	469	31.2
DFI (%BW/day)	5.39 a	4.94 a	4.96 a	4.57 a	3.66 b	0.27
FCR	2.29 a	2.09 a	2.10 a	2.01 a	1.61 b	0.12
PER	1.28 a	1.40 a	1.47 a	1.42 a	1.87 b	0.09

Mean of six replicates using initial weight as covariate

SEM = Standard Error of Mean

Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ )

Nevertheless, average SGR in quinoa diets was higher than in amaranth diets, 3.02 vs. 2.59, DFI was lower, 4.52 vs. 5.47, FCR was lower, 1.95 vs. 2.85, and PER higher, 1.54 vs. 0.96, respectively. Likewise, white shrimp fed most experimental diets had a higher SGR compared commercial diet, 2.50 % day<sup>-1</sup> (data not shown).

#### 4. Discussion

Results of the bromatological analysis for amaranth and quinoa seed meals were similar to the results reported by Virk & Saxena (2003) and Koziol (1992), respectively. Amaranth and quinoa have a protein content (Table 1) that is

comparable to alfalfa ( $173 \text{ g kg}^{-1}$ ) but higher than the values reported for oats ( $118 \text{ g kg}^{-1}$ ), sorghum ( $111 \text{ g kg}^{-1}$ ) and wheat ( $122 \text{ g kg}^{-1}$ ) (NRC 2011). In pseudo cereals, such as quinoa, albumins and globulins are the major protein fraction ( $440\text{--}770 \text{ g kg}^{-1}$  of total protein), which is greater than that of prolamins ( $5\text{--}7 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Koziol 1992). Crude fibre content of both meals was low when compared to the whole grain and other cereals (Koziol 1992).

Ash content in feeds decreased proportionally along with increases in the rate of inclusion of amaranth and quinoa, an effect that can be explained by the greater ash content of fishmeal compared to these meals (Table 1). The energy contained in the diets was  $160\text{--}170 \text{ MJ kg}^{-1}$ , which is similar to the reported standards for shrimp feeds (between  $87$  and  $180 \text{ MJ kg}^{-1}$  with an average of  $159 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) (Siccardi III 2006).

Both amaranth and quinoa have high levels of certain EAA (Table 1) in comparison with fish meal, so the EAA profile of experimental diets (Table 3) was very similar to control diet. Optimum levels of several EAA have been reported for penaeid shrimp by Akiyama, Dominy & Lawrence (1992), and particularly for *L. vannamei* by Fox, Lawrence & Li-Chan (1995), Fox, Davis & Lawrence (2011), Zhou, Zeng, Wang, Wang, Wang & Xie (2012), Xie, Zeng, Zhou, Wang, Wang, Zheng & Wang (2012) and Zhou, Wang, Wang & Tan (2013). These authors reported optimum dietary levels of some EAA,  $23 \text{ g kg}^{-1}$  Arginine,  $20 \text{ g kg}^{-1}$  Lysine,  $4 \text{ g kg}^{-1}$  Methionine and  $15 \text{ g kg}^{-1}$  Threonine, which are apparently covered by experimental diets (Table 3). However, a dietary methionine requirements of  $25 \text{ g kg}^{-1}$  or  $37 \text{ g kg}^{-1}$  protein was recommended respectively by Akiyama, Dominy & Lawrence (1992) and Fox, Lawrence, Patnaik, Forster, Ju & Dominy (2010) for shrimp feeds, so a potential deficiency in methionine may be responsible for the depressed growth of shrimp fed diets with higher levels of fish meal replaced by amaranth A-35 and A-45 if protein digestibility is taken into account (Fig. 2), because the availability of methionine is more likely to be reduced, as the situation worsens as fishmeal is replaced by amaranth in these diets. It is therefore reasonable to say that including amaranth would also have a negative effect on weight gain due to a lower availability of methionine. Thus, the optimal supplementation of methionine must be considered in future studies on this species. Likewise,

optimum requirements of Methionine, and other EAA, must be studied in *L. vannamei*, because the two cited available references (4 and 25 g kg<sup>-1</sup>) are very different, even considering other shrimp species (NRC 2011), in the interval of 7-9 g kg<sup>-1</sup> respectively for *Penaeus monodon* and *Marsupenaus japonicus*, whereas optimum levels of Lysine, for example, are very similar, 19-21 g kg<sup>-1</sup> for three species.

The data on pellet water stability showed that percent recovery of experimental diets was lower than commercial diets due to the different manual and industrial preparation processes, respectively. Amaranth diet stabilities were similar to those of control diet AQ0, with the exception of the highest replacement (A45), and they were generally high (>72%) after a 2 h period of submersion in seawater (Fig. 1). On the other hand, lower levels of pellet water stability were observed in diets replaced with 250, 350 and 450 g kg<sup>-1</sup> fish meal protein by quinoa protein, which may be attributed to its low amylose level, and firstly to the lower content of dietary corn starch, because although the starch granule has high swelling capacity, structural bonding is weak and the starch cannot withstand the stresses caused by swelling and water movement in diets with corn starch level lower than 150 g kg<sup>-1</sup>, A45, Q35 and Q45. Water stability of feeds containing amaranth and quinoa found in the present study was lower when compared with results reported by Molina-Poveda *et al.* (2013, 2014), 82-95% in lupin diets and 82-87% using corn gluten meal, all of which had corn starch levels up 300 g kg<sup>-1</sup>. The relatively poor stability of diets could affect their nutritional values of vitamins or amino acids, but Fox *et al.* (2010) reported a minimal leaching of methionine, and quinoa diets gave a good growth in comparison to commercial diet, which presented a higher stability.

In this study, palatability was not affected by the inclusion of quinoa in any of the fish meal replacement levels, but feed intake of diet Q45 was the lowest, which would show that the extraction of saponins in quinoa was not enough and the long term ingestion was affected with an inclusion of 550 g kg<sup>-1</sup>.

On the other hand, it has been reported that amaranth reduced feed intake, likely as a consequence of anti-nutritional factors accumulation (Montero-Quintero, Molina & Sánchez-Urdaneta 2011; Agbaire 2011), or tannins causing palatability problems due to the astringent taste (Joslyn & Goldstein 1964),

although no difference was observed in the current trial. Becker, Wheeler, Lorenz, Stafford, Grosjean, Betschart & Saunders (1981) evaluated 10 different samples of amaranth and found a range of 0.08-0.42 g kg<sup>-1</sup> of tannins. For example, it is known that carp are very sensitive to adverse taste caused by these factors (Becker & Makkar 1999). Tannin levels in the seed coat of amaranth are higher than those in the perisperm and dark-seeded varieties are known to have higher tannin levels than non-dark-seeded varieties (Lorenz & Wright 1984). Bressani, Elias & Garcia-Soto (1989) found an improvement in mean weight gain and in protein quality for the cooked grains, contrary to what was reported before by Pedersen, Hallgren, Hansen & Eggum (1987a). In the present work, grain amaranth of light-coloured seeds was used and amaranth was not processed, and although daily feed intake was similar to quinoa diets and control diet, the growth was lower, which could indicate the negative effect of anti-nutritional factors.

Quinoa meal, even at the highest level of protein replacement (450 g kg<sup>-1</sup>) in diets, can be effectively utilized by the shrimp, as evidenced by the non-significant differences in growth rate of shrimp from 0 to highest level of quinoa meal feed replacement in the diet, and the best feed conversion and protein efficiency of diet Q45. It seems clear that the essential amino acid composition was well balanced in the diet and the levels of anti-nutritional factors were below the levels that might inhibit growth in *L. vannamei*.

On the contrary, amaranth meal, even at 150 g kg<sup>-1</sup> substitution, gave a lower final weight, which agrees with the work of Adeniji, Fakoya, & Omamohwo (2007), who fed fingerlings of tilapia (*Oreochromis niloticus*) with diets containing 50 to 750 g kg<sup>-1</sup> *A. spinuosus*, and reported reduced growth of fish at all levels of inclusion. Other studies on the use of *A. spinuosus* leaf meals as dietary protein source have been conducted for tilapia and catfish, with variable results (Adeniji *et al.* 2007; Adewolu & Adamson 2011). Adewolu & Adamson (2011) also reported that up to 50 g kg<sup>-1</sup> of *A. spinosus* leaf meal can be included in a practical diet for African catfish *C. gariepinus* and in general there was a decreasing trend in growth rate of fingerlings with increasing inclusion level from 100 to 200 g kg<sup>-1</sup> in experimental diets. These results, which keep a similar pattern to the present study, might be due to presence in amaranth of

saponins, alkaloids, tannins, phytates and oxalates as anti-nutritional substances (Montero-Quintero *et al.* 2011; Agbaire 2011; Lorenz & Wright 1984). A serine proteinase inactivating proteins has also been isolated from seeds of grain *Amaranthus caudatus* L. (Hejgaard, Dam, Petersen & Bjørn 1994). Although this inhibitor of trypsin is very heat stable and is immediately inactivated by pepsin at pH 2 (Hejgaard *et al.* 1994), this inhibitor represents a potential anti-nutritional factor in feeds for shrimp that lack pepsin and whose digestive pH does not reach 2, but optimum pH for digestive enzymes in shrimp gut range between 4.5 and 9.5 (Lan & Pan 1990; Souza, Fernandes, Silva, Lemos, Bezerra & Souza 2009).

The decreasing level of digestibility of the diets in the shrimp with an increase in the level of amaranth meal replacement may result from the presence of serine proteinase inhibitor in this ingredient, which reaches high levels in diets A45 and A35. Lower digestibility of the amaranth diets 25, 35 and 45 in shrimp, as shown in the digestibility coefficients for dry matter and protein obtained in this study, may be another contributing factor in the poor growth of shrimp fed diets with various levels of amaranth meal replacement. On the other hand, even at the highest level of fishmeal replacement quinoa meal is still highly digestible and the ADMD (78 to 63%) and APD (87 to 78%) values obtained in this study are comparable to the results of Gutiérrez-Espinosa *et al.* (2011) and similar to those for other cereals, but these authors reported digestibility coefficients of quinoa meal in tilapia nilotica of 58.8-64.4%, for ADMD and 67.7-77.5% for APD in tiger shrimp.

The present study reported a high protein efficiency ratio (PER) and a relatively high apparent digestibility for washed quinoa compared to amaranth (70 vs 53 for ADMD and 82 vs. 68 for APD). Based on PER, protein digestibility and nitrogen balance Ranhotra, Gelroth, Glaser, Lorenz & Johnson (1993) found that the quality of protein in quinoa equals that of casein. On the other hand, Pedersen, Kalinowski & Eggum (1987b) using chemical score, suggested leucine, valine or threonine as the limiting amino acids in amaranth grain. Finally, considering the growth and feed conversion results, it seems that quinoa is a better ingredient than amaranth for substituting fish meal in white shrimp diets.

## 5. Conclusion

This study has demonstrated the acceptable nutritional value of quinoa meal as ingredient for shrimp diets, as this raw material can replace up to 45% of fish meal in feeds for *L.vannamei*. This species shows no adverse effect on growth, survival, feed palatability, intake and digestibility when fed with diets having up to 620 g kg<sup>-1</sup> of this ingredient. On the other hand, the amaranth meal was not an effective as an ingredient, but the exact causes for the growth-depressing effects of raw grain amaranth are unclear. Further studies are necessary to investigate whether processing amaranth by cooking and/or addition of limiting amino acids in diets should improve shrimp performance. In addition, it would be interesting to establish whether the use of quinoa protein concentrate can completely replace fish meal in diets for shrimps.

## Acknowledgements

The authors wish to express appreciation to Belgium Technical Cooperation for the financial support to conduct the research. Members of the staff at CENAIM are greatly acknowledged for their assistance. The English version of the manuscript was revised by Neil Macowan.

## References

- Adeniji C.A., Fakoya K.A. & Omamohwo V.R. (2007) Partial replacement of soybean cake with *Amaranthus spinosus* leaf meal in the diet of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* **50**, 335-338.
- Adewolu M.A., Adamson A.A. (2011) *Amaranthus spinosus* leaf meal as potential dietary protein source in the practical diets for *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *International Journal of Zoological Research* **7**, 128-137
- Agbaire P. (2011) Nutritional and Anti-nutritional Levels of Some Local Vegetables (*Vernonia anydalira*, *Manihot esculenta*, *Teifera occidentalis*, *Talinum triangulare*, *Amaranthus spinosus*) from Delta State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **15**, 625-628.

Akiyama D. M., Dominy, W. G. & Lawrence, A. L. (1992) Penaeid Shrimp Nutrition. In: *Marine Shrimp Culture: principles and practices* (ed by Fast, A.W. & Lester, L.J.), pp. 535-568. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, USA.

Amaya E.A., Davis, D.E. & Rouse, D.B. (2007a) Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* **262**, 393-401.

Amaya E.A., Davis, D.E. & Rouse, D.B. (2007b) Alternative diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* **262**, 419-425.

Antoine F.R., Wei, C.I., Littell, R.C. & Marshall, M.R. (1999) HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **47**, 5100–5107.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990) *Official Methods of Analysis*, 15th edn., 1298pp. AOAC, Arlington, VA, USA.

Bauer W., Prentice-Hernandez, C., Borges, M., Wasielesky Jr. & W., Poerch, L. (2012) Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **342-343**, 112-116.

Becker R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A. & Saunders, R.M. (1981) A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science* **46**, 1175-1180.

Becker K. & Makkar, H. (1999) Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* **175**, 327-335.

Brand C. & Colvin, L. (1977) Compounded diets for early postlarval *Penaeus californiensis*. *Proceeding of the annual meeting - World Mariculture Society* **8**, 811-820.

Bressani R., Elias, L.G. & Garcia-Soto, A. (1989) Limiting amino acids in raw and processed amaranth grain protein from biological tests. *Plant Foods for Human Nutrition* **39**, 223-234.

- Davis D.A. & Arnold, C.R. (2000) Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **185**, 291–298.
- Davis D.A., Arnold, C.R. & McCallum, I. (2002) Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* **8**, 87-94.
- Dersjant-Li Y. (2002) The use of soy protein in aquafeeds. In: *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. (ed. by Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G. & Simoes, N.), pp 541-558. Cancún, Quintana Roo, México.
- FAO (2011) La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Regional Office for Latin America and the Caribbean*. July 2011. 55pp.
- FAOSTAT (2011)  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID.567#ancor>.
- Foster J.R. & Gabbot P.A. (1971) The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* **51**, 943-961.
- Fox J. M., Lawrence, A. L. & Li-Chan, E. (1995) Dietary requirements for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* **131**, 279-290.
- Fox J.M., Lawrence, A.L., Patnaik, S., Forster, I., Ju, Z.Y. & Dominy, W. (2010) Estimation of feed level of methionine by *Litopenaeus vannamei* (Boone) using covalently-attached and crystalline sources in low-protein semi-purified diets. In: *Avances en Nutrición Acuícola X. Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. (ed. by Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D.A. & Gamboa, D.), pp 232-249. San Nicolás de la Garza, México.
- Fox J.M., Davis, D.A. & Lawrence, A.L. (2011) Evaluation of methionine supplements and their use in grain-based feeds for *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* **42**, 676-686.



Francis G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **199**, 197–227.

Gutiérrez-Espinosa M. C., Yossa-Perdomo, M. I. & Vásquez-Torres, W. (2011) Apparent digestibility of dry matter, protein and energy regarding fish meal, poultry by-product meal and quinoa for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Orinoquia* **15**, 169-179 (in Spanish with abstract in English).

Hanel R., Broekman, D., de Graaf, S. & Schnack, D. (2007) Partial replacement of fishmeal by lyophilized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in Pacific white shrimp diets. *The Open Marine Biology Journal* **1**, 1-5.

Harter T., Buhrke, F., Kumar V., Focken, U., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2011) Substitution of fish meal by *Jatrofa curcas* kernel meal: Effects on growth performance and body composition of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition* **17**, 542-548.

Hejgaard J., Dam, J., Petersen, L.C. & Bjørn, S.E. (1994) Primary structure and specificity of the major serine proteinase inhibitor of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) seeds. *Biochimica et Biophysica Acta* **1204**, 68–74.

Jacobsen S. E. (2003) The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International* **19**, 167-177.

Joslyn M.A. & Goldstein, J.L. (1964) Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Advances in Food Research* **13**, 179–217.

Ju Z.Y., Forster, I.P. & Dominy, W.G. (2009) Effect of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulate diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* **292**, 237-234.

Koziol M.J. (1992) Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis* **5**, 35–68.

Lan C.C. & Pan B.S. (1990) Effect of substrate on proteolytic enzyme activities of midgut gland of grass shrimp (*P. monodon*). *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* **29**, 33-42.

Lehman J. (1988) Carbohydrates of amaranth. *Legacy* **1**, 4-8. American

Amaranth Institute Bricelyn, MN.

Lim C. & Dominy W. (1990) Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* **87**, 53-63.

Lim C. & Dominy W. (1992) Substitution of full-fat soybeans for commercial soybean meal in diets for shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal Applied Aquaculture* **3**, 35-45.

Lim C. (1996) Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. *Journal World Aquaculture Society* **27**, 402-409.

Lim C., Beames, R.M., Eales, J.G., Prendergast, A.F., Mclesse, J.M., Shearer, K.D. & Higgs, D.A. (1997) Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture Research* **3**, 269-279.

Lorenz K. & Wright, B. (1984) Phytate and Tannin Content of Amaranth. *Food Chemistry* **14**, 27-34.

Martínez-Rocha L., Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D. & Cruz-Suarez, L.E. (2012) Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquaculture Research* **44**, 847-859.

Mbahinzireki G.B., Dabrowski, K., Lee, K.-J., El-Saidy, D. & Wisner, E.R. (2001) Growth, feed utilization and body composition of tilapia (*Oreochromis* sp.) fed with cottonseed meal-based diets in a recirculating system. *Aquaculture Nutrition* **7**, 189-200.

McGinnis A.J. & Kasting, R. (1964) Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **12**, 259-262.

Mente E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I. & Sorgeloos, P. (2002) Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *The Journal of experimental Biology* **205**, 3107-3122.

- Molina-Poveda C. & Morales, M.E. (2004) Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* **35**, 1158-1165.
- Molina-Poveda C., Lucas, M. & Jover, M. (2013) Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. *Aquaculture* **410-411**, 148-156.
- Molina-Poveda C., Lucas, M. & Jover, M. (2014) Utilization of corn gluten meal as a protein source in the diet of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* (On line version. DOI: 10.1111/anu.12209).
- Montero-Quintero K., Molina, E. & Sánchez-Urdaneta, A.B. (2011) Chemical composition of *Amaranthus dubius*: an alternative for human and animal feeding. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* **28**, 619–627.
- NRC (National Research Council) (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC. 376pp.
- Oujifard A, Seyfabadi, J., Kenari, A.A. & Rezaei, M. (2012) Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish meal. *Aquaculture* **342-343**, 56-61.
- Pedersen B., Hallgren, L., Hansen, I. & Eggum, B.O. (1987a) The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 2. As a supplement to cereals. *Plant Foods for Human Nutrition* **36**, 325-334.
- Pedersen B, Kalinowski, LS. & Eggum, B.O. (1987b) The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 1. Protein and minerals of raw and processed grain. *Plant Foods for Human Nutrition* **36**, 309-324.
- Peralta E., Mazón, N., Murillo, A., Villacrés, E., Rivera, M. & Subia, C. (2009) Catalogo de variedades mejoradas de granos andinos: Chocho, Quinoa y Amaranto, para la sierra del Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. Publicación Miscelánea No. 151. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA). Estación Experimental Santa Catalina, INIAP. Quito, Ecuador. 24pp.

Ranhotra G.S., Gelroth, J.A., Glaser, B.K., Lorenz, K.J. & Johnson, D.L. (1993) Composition and Protein Nutritional Quality of Quinoa. *Cereal Chemistry* **70**, 303–305.

Repo-Carrasco R., España, C. & Jacobsen, S.E. (2001) Valor nutricional y usos de la quinua (*Chenopodium quinoa*) y de la kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). In Memorias Primer Taller Internacional sobre Quinoa - Recursos Genéticos y Sistemas de Producción (ed. by Jacobsen S.-E., Portillo Z.), pp. 391-400. 10–14 May 2001. UNALM, Lima, Perú.

Ricque-Marie. D., Nieto-López, M., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Villareal-Cavazos, D., Peña-Rodríguez, A. & Cruz-Suárez, L.E. (2008) Métodos utilizados por la Universidad Autónoma de Nuevo León para determinar la digestibilidad in vivo en camarón. In: Manual de metodologías en digestibilidad “in vivo e in vitro” para ingredientes y dietas para camarón (ed by Cruz-Suárez, L.E., Villareal-Colmenares, H., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villareal-Cavazos, D. & Ricque-Marie, D.), pp:48-77. Universidad Autónoma de Nuevo León, NL, México.

Sá M.V.C., Sabry-Nieto, H., Cordeiro-Junier, E. & Nunes, A.J.P. (2012) Dietary concentration of marine oil affect replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* **19**, 199-210.

Shiau S.Y. (2008) Use of animal by-products in crustacean diets. In: *Alternative protein sources in aquaculture diets* (ed. by Lim, C., Webster, C. & Lee, C-S.), pp. 133-161. The Haworth Press, Inc, NY, USA.

Siccardi III A.J. (2006) Daily digestible protein and energy requirements for growth and maintance of subadult pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). PhD dissertation. Texas A&M University, College Station. 128pp.

Sookyin D. & Davis, D.A. (2011) Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture* **319**, 141-149.

Souza D., Fernandes, P., Silva, F.M., Lemos, D., Bezerra, L. & Souza, R. (2009) Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink

shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research* **40**, 861-870.

Suárez J.A., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., Suárez, A., Faillace, J. & Cuzonc, G. (2009) Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* **289**, 118-123.

Sudaryono A., Tsvetnenko, E. & Evans, L.H. (1999) Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquaculture Nutrition* **5**, 277-285.

Tacon A.G.J. & Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146-158.

Venero J.A., Davis, D.A. & Lim, C. (2008) Use of plant protein sources in crustacean diets. In: *Alternative protein sources in aquaculture diets* (ed. by Lim, C., Webster, C. & Lee, C-S.), pp. 163-203. The Haworth Press, Inc, NY, USA.

Virk P. & Saxena, P. K. (2003) Potential of *Amaranthus* seeds in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Bioresource Technology* **86**, 25–27.

Xie F., Zeng, W., Zhou, Q., Wang, H., Wang, T., Zheng, C. & Wang, Y. (2012) Dietary lysine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **358-359**, 116-121.

Ye J.D., Wang, K., Li, F.D, Sun, I.Z. & Liu, X.H. (2011) Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein level. *Aquaculture Nutrition* **17**, 337-347.

Ye J.D., Liu, X.H., Kong, J.H., Wang, K., Sun, I.Z, Zhang, C.X., Zhai, S.W. & Song, K. (2012) The evaluation of practical diets on a basis of digestible crude protein, lysine and methionine for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* **18**, 651-661.

Zar J.H. (1999) Biostatistical Analysis, 4th edn. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 663 pp.

Zhou Q.C., Zeng, W.P., Wang, H.L., Wang, T., Wang, Y.L. & Xie, F.J. (2012) Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **364–365**, 252–258.

Zhou Q.C., Wang, Y.L., Wang, H.L. & Tan, B.P. (2013) Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **392–395**, 142–147.

## CAPITULO IV

### DISCUSION GENERAL

Las principales razones para la reducción en el crecimiento observado en experimentos previos en los que la HP fue sustituida por fuentes alternativas de proteínas se han atribuido a factores anti-nutritivos y un inadecuado equilibrio de aminoácidos y minerales en las fuentes probadas (Lim y Dominy, 1991).

#### 4.1 Consumo y Factores Antinutricionales

Los resultados de palatabilidad en el presente estudio revelaron una mejor aceptación de la dieta LKM0 (8,4% d<sup>-1</sup>) en comparación con el resto de las dietas del ensayo. El consumo de alimento para dietas LKM 75 y LKM 100 fueron los más bajo entre todas las otras dietas conteniendo altramuz (3,4% d<sup>-1</sup>). Es conocido que la mayoría de las fuentes de nutrientes derivadas de plantas contienen una amplia variedad de sustancias antinutricionales (Francis *et al.*, 2001). Algunos factores antinutricionales han sido reportados como la causa para una pobre palatabilidad en muchas especies. Así por ejemplo, taninos (1,5-3,0%) y glucosinatos (<30 µmol/g) presentes en la harina de canola pueden tener un efecto adverso en la aceptación del alimento si este ingrediente es incluido en altos niveles en la dieta (McCurdy y March, 1992). En otro aspecto, los alcaloides presente en altramuz han sido atribuidos a causar el bajo crecimiento de la trucha arcoiris (De la Higuera *et al.*, 1988; Glencross *et al.* 2006). El presente estudio muestra que una sustitución de HP en la alimento para el camarón afecta negativamente el consumo de alimento, sobre todo con las dietas LKM75 y LKM100. Esta respuesta parece estar ligada a una disminución en la palatabilidad del alimento cuando HP se sustituye con altramuz. Aunque niveles de alcaloides >100 mg kg<sup>-1</sup> han sido reportado como la causa de problemas de palatabilidad en las dietas de trucha arco iris (Serrano *et al.*, 2008), no ha habido informes de problemas directamente atribuidas a los alcaloides en las dietas de los camarones (Adler y Kittelson, 2004; Glencross, 2001; Smith *et al.*, 2007b). Los niveles de alcaloides de diversas especies de altramuz cultivados varían desde 2,5 hasta 10% (Glencross, 2001; Petterson, 2000) y en el caso de *L. mutabilis* los niveles por lo general se han encontrado a ser >3% (Peralta *et al.*, 2009). Aunque, la solución utilizada en este estudio para reducir el nivel de alcaloides en las

semillas de altramuz fue extracción acuosa, parece que esto no fue suficiente para evitar el sabor amargo que los alcaloides imparten. Smith *et al.* (2007b) examinaron la influencia del alcaloide gramina cuando fue incluido en las dietas suministradas a camarón tigre negro, *P. monodon*, y encontraron que los niveles de inclusión de hasta 900 mg kg<sup>-1</sup> de gramina no afectaron significativamente el consumo diario de alimento durante un período 6h, probablemente debido a la lentitud de alimentación y rápida lixiviación de gramina desde el alimento. Es posible que la diferencia en la respuesta observada en el presente estudio puede haber sido influenciado por el tipo de alcaloide presente en *L. mutabilis* o por la presencia de algún tipo de compuesto repelente y por el hecho de la cantidad de alimento consumido se determinó a través de una periodo de 2 h. En todos los casos, la ingesta de las dietas experimentales se redujo claramente por una alta inclusión de LKM (27-36%), coincidiendo en parte con Sudaryono *et al.* (1999), quienes informaron una menor ingestión con la inclusión de harina de altramuz descascarado de 30 a 40%. Saraç *et al.* (1998) obtuvieron mayores niveles de inclusión de harina de altramuz completo, descascarado y concentrado sin efectos sobre el consumo, aunque el crecimiento de camarón tigre *P. monodon* se redujo.

En tanto que una clara relación inversa entre los niveles dietéticos CGM y palatabilidad, variando de 8,4% por día en la dieta CGM 0 a 3,1% por día en la dieta CGM 100. La palatabilidad de la dieta comercial fue 4,19%. La utilización de más de 10% de otras fuentes de proteína marina como harina de calamar o camarón, es una práctica común para facilitar niveles de reemplazo superior HP (Smith *et al.*, 2000) sin embargo en el presente trabajo no fue suficiente para estimular el consumo de los alimentos conteniendo CGM.

Aunque no se observó ninguna diferencia estadística en el ensayo actual se ha informado de que la ingesta reducida de alimentación de amaranto, probablemente como consecuencia de la acumulación de factores antinutricionales (Agbaire, 2011; Montero-Quintero *et al.*, 2011), o taninos que causan problemas de palatabilidad debido al sabor astringente (Joslyn y Goldstein, 1964) como ha sido reportado en carpa (Becker y Makkar, 1999).

Becker *et al.* (1981) evaluaron 10 diferentes muestras de amaranto y encontraron un rango de 0.08–0.42 g kg<sup>-1</sup> de taninos. Niveles de tanino en la



cubierta de la semilla del amaranto son más altos que aquellos del perisperma y se conocen variedades oscuras sin semillas a tener niveles más altos de taninos que las variedades de semillas no oscuras (Lorenz y Wright, 1984). En el presente trabajo, se utilizó el amaranto de grano de las semillas de color claro y no fue procesado, y aunque el consumo de alimento diario era similar a las dietas de quinua y dieta de control, el crecimiento fue menor, lo que podría indicar el efecto negativo de los factores antinutricionales.

A pesar de que la quinua es un pseudocereal con un alto contenido de proteína, muchos de factores antinutricionales tales como saponinas, ácido fítico, inhibidores de tripsina y taninos (Ruales y Nair, 1993; Ando *et al.*, 1999) han sido encontrados en ésta planta. Las saponinas son glucósidos de plantas que derivan su nombre de su capacidad para formar espumas de jabón en soluciones acuosas. Ellos ocurren principalmente en un gran número de especies de plantas, y han sido implicados como factores determinantes de resistencia al ataque de insectos y microbios (Francis *et al.*, 2002). Las saponinas son altamente tóxicas para especies acuáticas (Terazaki *et al.*, 1980; Boyd, 1990; Francis *et al.*, 2002). Chen *et al.* (1996) reveló que *M. japonicus* expuesto a diversas concentraciones de saponinas, disminuye la frecuencia de muda, alimentación y crecimiento, en tanto que las tasas de consumo de oxígeno y excreción de amonio se incrementan indistintamente de la salinidad en que se desarrolle la producción (Chen y Chen, 1997).

Según Chauhan *et al.* (1999), el valor alimenticio de la quinua es bajo cuando es suministrada de forma cruda pero cuando es lavada antes de ser utilizada en la alimentación su valor biológico mejora. Las saponinas parecen estar concentradas en la cáscara de la semilla de la quinua y el descascarado de la quinua se ha encontrado que reduce el contenido de saponina de 85.2 a 98.8% (Reichert *et al.*, 1986). El lavado de la quinua ha demostrado ser un modo efectivo para remover las saponinas, lo cual sugiere que las saponinas o algún otro factor antinutricional soluble en agua pudiera ser el responsable para el crecimiento retardado como se observa en los pollos de engorde (Improta y Kellems, 2001) y disminución la ingesta y la conversión alimenticia en ratas (Ruales y Nair, 1993) cuando la quinua es incorporada en forma cruda.

En este estudio, la palatabilidad no se vio afectada por la inclusión de quinua descascarada en cualquiera de los niveles de reemplazo de HP, pero el consumo de alimento de la dieta Q45 fue el más bajo, lo que muestra que la extracción de saponinas en quinua no era suficiente y el largo plazo la ingestión fue afectado con una inclusión de 550 g kg<sup>-1</sup>.

#### **4.2 Aminoácidos y crecimiento**

Según Houser y Akiyama (1997), el valor de una fuente proteica para crustáceos está determinado por la cantidad de aminoácidos que están disponibles para éstos. Se conoce que un imbalance de aminoácidos dietéticos conducen a una reducción en la síntesis de proteína que es esencial para proveer el crecimiento del animal (Mente *et al.*, 2002).

La Met y Lis son probablemente los aminoácidos más limitantes y costo-efectivos en la formulación de alimentos comerciales. De los cuatro ingredientes evaluados el altramuz y quinua mostraron cubrir el requerimiento nutricional de la especie y así el crecimiento no se vio afectado hasta un reemplazo cercano al 50% de la HP que en términos de inclusión de estos ingredientes equivalen a alrededor del 32% de la proteína total de la dieta. A este nivel de reemplazo de la HP el nivel de Met cubrió el requerimiento y así el crecimiento no se vio afectado a pesar del menor nivel de Met (1,6% de proteína) en la dieta LKM50, la ganancia en peso y TCE no fueron significativamente diferentes de la dieta control. Esto se puede atribuir en parte a la presencia de cisteína que baja el uso de la Met para la síntesis de proteínas y disminuye el requerimiento de Met (Moon y Gatlin, 1991; Goff y Gatlin, 2004).

Por otra parte, puede ser que la cantidad de Met recomendada para la nutrición del *L. vannamei* por Akiyama *et al.* (1992) esta sobreestimada, como fue sugerido por Fox *et al.* (2006, 2011). Estos autores encontraron que cuando se alimenta con 35% de proteína el requerimiento aparente de Met fue, de hecho, 1,14% de proteína, una cantidad menor que lo reportado (2,4%) por Akiyama *et al.* (1992). Todos estos niveles se considerarían más bajo que el nivel recomendado para las dietas de camarón de alrededor de 2,4% (Akiyama *et al.*, 1992).

El contenido Met (% de proteínas de la dieta) en las dietas del ensayo con CGM disminuyó de 2,5% (control CGM0) a 2,0% en CGM25 y CGM50 mientras que las dietas con amaranto A-15 y A-25 que proporcionaron 2,6-2,8% de proteína, serían las únicas dietas capaces de satisfacer estas necesidades. Sin embargo, si se toma en cuenta digestibilidad de la proteína, es más probable que la disponibilidad de Met sea reducida, situación que empeora a medida que la HP se sustituye por CGM y amaranto en estas dietas. Por tanto, es razonable decir que incluyendo CGM y amaranto también tendría un efecto negativo sobre la ganancia en peso debido a una menor disponibilidad de la Met.

Cuando consideramos la re-evaluación de los requerimientos, hechos por Fox *et al.* (2006, 2011), a 1,14% de proteína, todas las dietas CGM cubriría los requerimientos de Met. Sin embargo, si se tiene en cuenta la pobre digestibilidad de Met, los requerimientos sólo estarían cubiertos por las dietas CGM0 (2,10%), CGM25 (1,52%) y CGM50 (1,24%), pero no por CGM75 o CGM100 (0,98%).

A partir de estos resultados, parece que la actual recomendación de necesidad dietaria de Met es mucho más alta que el requerimiento real, cuando las dietas contienen 35% de PC. Esto es claramente un tema que necesita ser resuelto.

Las dietas que contenían CGM en los diferentes niveles de reemplazo al igual que las dietas de altramuza LKM75 y LKM100 ninguna de ellas fue capaz de satisfacer estas necesidades de Lis (1,8 – 4,3% y 3,9 y 3,6%, respectivamente) puesto que contenían niveles más bajos que lo establecido en *L. vannamei* por Fox *et al.* (1995): 4,5% de PC y más recientemente por Xie *et al.* (2012): 4,9% de PC.

Tanto el amaranto y la quinua tienen un alto nivel de ciertos EAA en comparación con la HP, entre ellos la Lis estuvo por encima (6,7 a 7,5% de PC) de los establecidos por Fox (1995) y Xie *et al.* (2012). Con excepción del amaranto en este estudio, las dietas con quinua no registraron diferencias significativas respecto al uso eficiente de la proteína por parte de los camarones, dando de esta manera como resultado una buena ganancia en peso corporal. Esta carencia de diferencias significantes entre las dietas sugiere que todos los camarones alimentados con harina de quinua a cualquier

nivel de reemplazo tuvieron alta eficiencia proteica debido a que los aminoácidos comúnmente limitantes (Lis y Met) probablemente estuvieron biológicamente disponibles en la cantidad adecuada.

Es razonable suponer que un reemplazo de 75 y 100% de HP con LKM y a cualquier nivel de CGM bajo condiciones isonitrogenadas e isocalóricas también tendría un efecto negativo sobre el aumento de peso debido a la deficiencia de Lis, acentuado por la deficiencia de Met y los niveles significativamente más bajos de consumo de estas dos dietas. La combinación de bajos niveles de Met y Lis en la proteína de altramuz y menor digestibilidad en CGM parece limitar el valor nutricional del alimento. Por lo tanto, la suplementación óptima de Lis y eventualmente otros AAE tales como Met debe ser considerada en futuros estudios con el camarón.

La productividad natural de los estanques puede ser importante en la alimentación de camarones. Los experimentos de crecimiento realizados en jaulas en estanques de tierra demostraron que, a diferencia del estudio realizado en el acuario, el aumento gradual de LKM en las dietas no produjo una disminución significativa en el crecimiento de camarones incluso cuando toda la HP en los alimentos experimentales fue reemplazada por LKM. Esto es por que las jaulas sin fondo permitieron al camarón tener acceso libre al sustrato, y a la flora y fauna que allí se encuentran. La estimación del porcentaje de contribución de la productividad natural a partir de los datos obtenidos en este estudio indica que había una demanda nutricional de 26 a 31% para *L. vannamei* sembrado a 30 m<sup>2</sup>. Lawrence y Houston (1993) estimaron un porcentaje de contribución de la productividad natural de 83% y 77% para *L. vannamei* sembrado a 15 y 20 m<sup>2</sup>, respectivamente. Estas diferencias se deben principalmente a las densidades de población más bajas y un periodo experimental más cortos (28 días) en comparación con el presente trabajo (45 días). Conceptualmente, a medida que las densidades de siembra y la biomasa cosechada aumentan en un estanque de tierra, el porcentaje de contribución a los requerimientos nutricionales del camaron disminuiría. Las diferencias en respuesta al reemplazo de la HP (50% en acuarios vs 100% en jaulas) y el crecimiento entre los resultados observados en los acuarios (promedio 0,64g/semana) y jaulas (promedio 0,98g/semana sin incluir

tratamiento no alimentado) podrían atribuirse al ensayo que se realiza en estanques donde la productividad natural complementa cualquier imbalance de aminoácidos en las dietas evaluadas. Además, la mejora del crecimiento se ha atribuido al consumo de los camarones de las microalgas y de los agregados microbianos-detrítico presentes en el agua del estanque (Moss y Pruder, 1995), que además de las enzimas exógenas (Moss *et al.*, 2001), suministros de compuestos esenciales que faltan en la dieta del camarón (Tacón *et al.*, 2002) e incremento por niveles desconocidos de factores de crecimiento (Leber y Pruder, 1988).

### **4.3 Estabilidad de las dietas**

La hidroestabilidad de los alimentos para camarones se puede lograr ya sea por procesos de extrusión o peletización, desencadenando la gelatinización de los almidones lo cual se evidenció en las dietas comerciales usadas como referencia externa en los trabajos de gluten de maíz, amaranto y quinua. Además, si la estabilidad en el agua es insuficiente, la inclusión de un agente de aglutinación durante la fabricación es necesario con el fin de reducir la pérdida de materia seca. En el presente estudio se empleo carboximetil celulosa como aglutinante entre 3 y 4% en las dietas experimentales y se utilizó un molino de carne como un equipo de peletización sin dispositivo de calentamiento. El molino consiste en un barril de 10 cm de diámetro de acero inoxidable en cuyo interior un motor dirige el movimiento del tornillo. Una placa de matriz con agujeros de 2 mm de diametro fue fijado en el extremo de descarga del barril. La mezcla semi húmeda fue peletizada en el molino de carne utilizando un troquel de 2 mm alcanzando una temperatura de 70-75°C. Rout y Bandyopadhyay (1999) trabajando sobre la hidroestabilidad de las dietas demostraron que el porcentaje de recuperación de materia seca de las dietas experimentales fue menor que las dietas comerciales debido a los diferentes procesos de preparación manual e industrial, respectivamente. Estos autores reportaron que la estabilidad de alimentos para camarón acondicionados en una estufa a 105 oC por 10 min sin aglutinante artificial usando harina de trigo 282 g kg<sup>-1</sup> y peletizados en un procesador de carne sin sistema de calentamiento fue de 42%. Aglutinantes naturales más utilizados, tales como almidones de cereales, requieren un control adecuado de calor, la

humedad y tiempo para la activación completa (Lim y Curzon, 1994). Ordinariamente, el equipo de tipo molino de carne no proporciona tales condiciones.

Después de 2 horas de inmersión en el agua la estabilidad de los alimentos que contienen el amaranto y la quinua encontrado en el presente estudio (66-73% y 47-72%, respectivamente) fue menor en comparación con los resultados reportados en las dietas de altramuza (82 a 95%) y usando harina de gluten de maíz (82 a 87%), todas estas dietas tenían niveles de almidón de maíz hasta 300 g kg<sup>-1</sup> que era superior a las dietas A25-A45 y Q25-Q45 que tuvieron niveles de 232 g kg<sup>-1</sup> hacia abajo. Esto fue una de las razones porque menores niveles de hidroestabilidad fueron observados en las dietas reemplazadas con 250, 350 and 450 g kg<sup>-1</sup> proteína de HP por proteína de quinua. Aunque era de esperarse que los almidones presente en el amaranto y la quinua llevaran el contenido de almidón de las dietas por sobre los 300 g kg<sup>-1</sup> probablemente sus conformaciones amilosa:amilopectina así como tamaño de los granulos de almidón y temperaturas de gelatinización hayan contribuido a la baja capacidad de aglutinación porque aunque el gránulo de almidón tiene una alta capacidad de hinchamiento, la unión estructural es débil y el almidón de quinua y amaranto no puede soportar las tensiones causadas por la hinchazón y el movimiento del agua en dietas con un nivel de almidón de maíz más bajo que 150 g kg<sup>-1</sup>, A45, Q35 y Q45.

La relativamente pobre estabilidad de las dietas podría afectar a sus valores nutricionales de vitaminas o aminoácidos, pero Fox *et al.* (2010) reportaron una lixiviación mínima de metionina, y las dietas de quinua hacerle un buen crecimiento en comparación con la dieta comercial, que presenta una mayor estabilidad. En los estudios que se evaluaron las dietas de altramuza y gluten de maíz que presentaron estabilidades del 82 a 95% no se aplicaron formulas de corrección del cálculo de la digestibilidad no así cuando se evaluó las dietas de quinua y amaranto que tuvieron mas baja hidroestabilidad entre 47 y 72% donde se hizo la corrección por la pérdida de materia seca al calcular los coeficientes de digestibilidad. Aunque esto limita hacer inferencias exactas sobre la digestibilidad de los nutrientes valorados al menos permite tener valores aproximados a la digestibilidad de los ingredientes ensayados.

#### 4.4 Utilización del alimento

Los resultados de DAMS de menor a mayor nivel de substitucion de HP fueron de 78-63% para quinua, 73-66% para altramuz, 71-69% gluten de maíz y 72-36% para amaranto y mientras la DAPC fue de 87-78% quinua, 78-76% altramuz 84-57% amaranto y 69-52% gluten de maíz. Estos resultados muestran que entre los ingredientes evaluados la quinua y el altramuz fueron los mas digeribles siendo el gluten de maíz y el amaranto los mas pobremente digeridos llegando a menos del 60% la DAPC en el nivel mas alto de reemplazo.

Los resultados del presente estudio indican claramente que las DAMS de la dieta sin CGM fueron mayores que la de cualquiera de las otras dietas que contienen CGM. Del mismo modo, DAPC tendió a disminuir a medida que los niveles de CGM aumentaron, y fue muy baja (52 a 55% en las dietas que contienen altos niveles de CGM. Estos valores de DAPC son los más bajos citado en camarón blanco con otros ingredientes resultando en una mayor DAPC (>73 %) con el guisante (Davis *et al.*, 2002), subproductos de pollo (Cruz-Suárez *et al.*, 2007), harina de carne de porcino (Hernández *et al.*, 2008), una mezcla de animales terrestres con CGM (Ye *et al.*, 2011), la harina de cabeza de camarón (Ye *et al.*, 2012). Además, Espinoza (2013) estudiando también al *L. vannamei*, informó que el DAPC del concentrado de proteína de maíz fue del 63%. Esto a pesar de ser un ingrediente más refinado con un mayor nivel de proteína (75% frente al 60% de gluten de maíz) y el hecho de que la dieta experimental se extruyó a 110 °C y 40-50 atm. Estas diferencias no son, sin embargo evidente en trabajos publicados por Lemos *et al.* (2009) y Yang *et al.* (2009) quienes utilizando una dieta de referencia estudiaron la DAPC de varios ingredientes, incluyendo CGM. Ambos grupos de autores informaron de un DAPC muy diferente de CGM, con Lemos *et al.* (2009) reportaron un valor del 59% y Yang *et al.* (2009) 88%, lo que sugeriría una diferencia en el proceso de producción de CGM podría existir. En este mismo sentido, la disponibilidad de aminoácidos en general refleja la DAPC de las dietas experimentales, con el promedio de ADAA decreciendo a medida que los niveles de CGM aumentaron en las dietas. Con la excepción de Lys y Arg, la disponibilidad de aminoácidos esenciales se redujo a 30% después de la

sustitución de 100% de la HP. Al estudiar el alimento para el camarón blanco, Yang *et al.* (2009) reportaron que CGM resultó en una menor ADAA que la soya, maní, gluten de trigo, subproductos de camarones y HP. La mayor disponibilidad de Arg y Lys observado en el actual estudio demuestra que *L. vannamei* son capaces de utilizar eficazmente estos dos aminoácidos.

La disminución de la digestibilidad de las dietas en el camarón con el aumento en el nivel de reemplazo de la harina de amaranto puede resultar de la presencia del inhibidor de la serina proteinasa en el amaranto, los cuales alcanza niveles altos en las dietas A45 y A35. La menor digestibilidad de las dietas de amaranto 25, 35 y 45% en el camarón, como se muestra en los coeficientes de DAMS y DAPC obtenida en este estudio, puede ser otro factor que contribuye a la falta de crecimiento de camarones alimentados con dietas con diferentes niveles de reemplazo de la harina de amaranto. Además, Pedersen *et al.* (1987b), utilizando el marcador químico, sugirió que la leucina, valina o treonina como los aminoácidos limitantes en grano de amaranto.

Por otro lado, incluso en el más alto nivel de reemplazo de la HP por harina de quinua sigue siendo altamente digestible y los valores de las DAMS y DAPC obtenidos en este estudio son comparables a los resultados de Gutiérrez-Espinosa *et al.* (2011) y similares a los de otros cereales, pero estos autores reportaron en tilapia nilotica coeficientes de digestibilidad de la harina de quinua de 58,8 a 64,4% para DAMS y de 67,7 a 77,5% para DAPC en el camarón tigre. El presente estudio informó una alta tasa de eficiencia proteica (PER) y una relativamente alta digestibilidad aparente de la quinua lavada en comparación con el amaranto (70 vs 53% de DAMS y 82 vs 68% de DAPC). Basado en el PER, la digestibilidad de la proteína y el balance de nitrógeno, Ranhotra *et al.* (1993) encontraron que la calidad de la proteína en quinua es igual a la de la caseína.

Así mismo el otro ingrediente que dio buenos coeficientes de digestibilidad fue el altramuz a pesar de que una disminución significativa en DAPC fue observada cuando la HP fue sustituida por cualquier incremento de LKM en comparación con la dieta control. El valor de DAPC en las dietas conteniendo LKM sin diferencias entre las dietas fue inferior a los de Sudaryono *et al.* (1996, 1999a). En juveniles *P. monodon*, sin embargo, DAPC aumentó gradualmente



y fue positivamente relacionado con los niveles de harina de altramuz (Sudaryono *et al.*, 1999a). Cuando se alimentaron las harinas de semillas descascaradas y enteras de altramuz a *P. monodon*, se encontró que las DAMS y DAPC de la harina de semilla de altramuz descascarado fue mayor que el de los enteros (Sudaryono *et al.*, 1999b). Estas mejoras se atribuyen a una reducción en polisacáridos indigeribles no almidonoso insolubles (NSP, es decir, celulosa, hemicelulosa y ligninas), que se compone de una fracción de hidratos de carbono soluble y una insoluble (Sinha *et al.*, 2011), y son principalmente encontrados en la cubierta de la semilla. En el presente estudio la semilla de altramuz fue descascarado antes de hacer la harina y por lo tanto la reducción de la digestibilidad no se puede atribuir a la presencia de NSP en la cubierta de la semilla. En altramuz, el NSP soluble son predominantemente oligosacáridos compuesto generalmente de homólogos de  $\alpha$ -galactosil de sucrosa y que van desde 7 hasta 12% de materia seca (Trugo y Almeida, 1988).

En altas concentraciones, podrían ser considerados componentes anti-nutricionales para algunas especies. En ambos *L. angustifolius* y *L. albus*, el proceso de extracción con etanol elimina fracciones de carbohidratos solubles comprendidos en una gran proporción de oligosacáridos (70%) (Coon *et al.*, 1990) y también ha sido reportado para mejorar el valor nutricional del altramuz para la trucha. Glencross *et al.* (2003) al examinar la influencia de oligosacáridos en la harina de semilla *L. angustifolius* cuando alimentó a la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, demostró que los oligosacáridos tuvieron un efecto negativo sobre la digestibilidad de los nutrientes y la energía de las dietas evaluadas. La eliminación del componente soluble en etanol de la harina de altramuz tuvo la más grande influencia en la digestibilidad de energía, nitrógeno, materia orgánica y componentes exentos de nitrógeno. Las fracciones de NSP pueden ser perjudiciales para la digestión porque alteran el vaciado gástrico, velocidad de paso, la fisiología y la morfología intestinal, la microflora nativa intestinal y la capa de mucus del intestino, obstruir la actividad de la enzima digestiva por el cambio de viscosidad de la digesta (Sinha *et al.*, 2011). Aunque el NSP no fue determinado en este estudio, el potencial anti-nutritivo del NSP podría tener un efecto en *L. vannamei* debido a que los

tratamientos LKM descascaradas tuvieron menor DAMS y DAPC que el control sin LKM. Esto apoya la hipótesis de que los oligosacáridos pueden interferir con la digestión de otros nutrientes cuando se alimenta a *L. vannamei*, y sugiere que el contenido de oligosacáridos de *L. mutabilis* también puede estar influyendo en el valor nutricional de sus propias proteínas.

En general, la calidad de la proteína de los ingredientes de la dieta es el factor más importante que afecta al rendimiento de los camarones, y la digestibilidad de la proteína es la primera medida de su disponibilidad para el camarón. La calidad de la proteína de fuentes de proteínas en la dieta depende de la composición de aminoácidos y la digestibilidad. Los resultados de este estudio sugieren que los coeficientes de digestibilidad de proteínas de las dietas CGM son indicativos de una digestibilidad de aminoácidos promedio como es mostrado en el estudio de CGM. Sin embargo, debido a la variación en la disponibilidad de aminoácidos individuales en los alimentos ensayados, el uso de coeficientes de digestibilidad de aminoácidos específicos puede proporcionar formulaciones de alimentos más precisa y económica.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

La mayoría de los cambios observados en los parámetros evaluados son la causa antes que la consecuencia de los cambios en el crecimiento. Todos los resultados indican que la tasa de crecimiento bajo condiciones de laboratorio, se vio afectada por el consumo del alimento, la deficiencia de Met y Lis y la digestibilidad de la proteína de gluten de maíz y altramuz. Ya que las dietas ensayadas contenían niveles de proteína muy cerca uno del otro este nutriente no puede ser considerado como un factor que influyó en el crecimiento del camarón.

Los experimentos aquí presentados revelan que los alimentos a diferentes niveles de sustitución de HP se desempeñaron significativamente mejor en camarones alimentados en estanque de la camaronera que en el agua de mar clara del laboratorio. Por lo tanto y de acuerdo a estos resultados, *L. mutabilis* Sweet es una potencial fuente de proteína para reemplazar la HP en alimentos comerciales para la fase de engorda del *L. vannamei*.

El grano de amaranto no fue eficiente como ingrediente, debido a la baja digestibilidad tanto de materia seca como de proteína y aunque el consumo del alimento no se vio afectado si se redujo los aminoácidos esenciales como la Met y Lis que quedaron disponibles para síntesis de nueva proteína por parte del camarón.

La quinua tiene un gran potencial como ingrediente alimenticio para reemplazar a la costosa HP sin afectar el rendimiento del camarón juvenil *L. vannamei*. Los camarones demostraron digerir eficientemente la proteína de la quinua en todos los niveles de reemplazo evaluados, y también presentaron una buena DAMS. El lavado previo de la quinua fue efectivo en eliminar algunos factores antinutricionales reportados en las semillas de la quinua.

## 5.2 Referencias

- Adewolu, M.A., Adamson A.A., 2011. *Amaranthus spinosus* leaf meal as potential dietary protein source in the practical diets for *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. International Journal of Zoological Research 7, 128-137
- Adler, L.S., Kittelson, P.M., 2004. Variation in *Lupinus arboreus* alkaloid profiles and relationships with multiple herbivores. Biochemical Systematics and Ecology 32, 371-390.
- Adler, L.S., Kittelson, P.M., 2004. Variation in *Lupinus arboreus* alkaloid profiles and relationships with multiple herbivores. Biochemical Systematics and Ecology 32, 371-390.
- Agbaire P., 2011 Nutritional and Anti-nutritional Levels of Some Local Vegetables (*Vernonia anydalira*, *Manihot esculenta*, *Teifera occidentalis*, *Talinum triangulare*, *Amaranthus spinosus*) from Delta State, Nigeria. Journal of Applied Sciences and Environmental Management 15, 625-628.
- Ahamed, N.T., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., Pal, M., 1998. A lesser known grain, *Chenopodium quinoa*; review of the chemical composition of its edible parts. Food and Nutrition Bulletin 19, 61-70.
- Akiyama, D. M., Dominy, W. G., Lawrence, A. L., 1992. Penaeid Shrimp Nutrition. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), Marine Shrimp Culture: principles and practices. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, USA, pp. 535-568.
- Akiyama, D.M. 1988. Soybean meal utilization by marine shrimp. AOCS world congress on vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs, Singapore, October 2-7. American Soybean Association, Singapore.
- Akiyama, D.M. 1991. Soybean meal utilization by marine shrimp. In: Akiyama, D.M., R.K.H. Tan, (Eds.), Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thailand and Indonesia, September 19-25. American Soybean Association, Singapore, pp. 207-225
- Alam, Md. S., Teshima, S.-I., Ishikawa, M., Hasegawa, D., Koshio, S., 2004. Dietary arginine requirement of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate). Aquacult. Res. 35, 842–849.
- Alava, V.R., Lim, C., 1983. The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juveniles in a controlled environment. Aquaculture 30, 53–61.
- Alexander, C., Sahu, N.P., Pal, A.K., Akhtar, M.S., Saravanan, S., Xavier, B., Munilkumar, S., 2011. Higher water temperature enhances dietary carbohydrate utilization and growth performance in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 95, 642–652.
- Amouroux, J.M., Cuzón, G., Gremare, A., 1997. Association of pulse chase design, compartmental analysis and analog modeling to assess absorption and assimilation efficiencies in *Penaeus stylirostris* fed an artificial diet. Aquaculture 149, 71 – 86.
- Ando, H., Tang-HanJun, K. Watanabe, T. Mitsunaga, Tangm H.J., 1999. Characteristics of quinoa as a foodstuff. Part 1. Characteristics of the food

component in quinoa in comparison with other cereals. Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, No 7 pp. 107-111.

Andrews, J.W., Sick, L., Baptist, G., 1972. The influence of dietary protein and energy level on growth and survival of penaeid shrimp. *Aquaculture* 1, 341–347.

Antoine, F.R., Wei, C.I., Littell, R.C., Marshall, M.R., 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 5100–5107.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1298pp.

Aquacop, 1977. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon*, Fabricius in Polynesia. *Proc. World Maricult. Soc.* 8, 927 – 945.

Aranyakananda, P., Lawrence, A.L., 1993. Dietary protein and energy requirements of the white-legged shrimp, *Penaeus vannamei* and the optimal protein to energy ratio From Discovery to Commercialization. *European Aquaculture Soc., Oostende, Belgium*, p. 21.

Arnesen, P., Krogdhal, A., Sundby, A., 1995. Nutrient digestibilities, weight gain and plasma and liver levels of carbohydrate in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fed diets containing oats and maize. *Aquacult. Nutr.* 1, 151 – 158.

Bages, M., Sloane, L., 1981. Effects of dietary protein and starch levels on growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) postlarvae. *Aquaculture* 25, 117 – 128.

Balazs, G.H., Ross, E., 1976. Effect of protein source and level on growth and performance of the captive freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 7, 299 – 313.

Bautista, M.N., 1986. The response of *P. monodon* juveniles to varying protein/energy ratios in test diets. *Aquaculture* 53, 229 – 242.

Bautista-Teruel, M., Eusebio, P.S., Welsh, T.P., 2003. Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225, 121-131.

Becker R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A., Saunders, R.M., 1981. A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science* 46, 1175-1180.

Becker K., Makkar, H., 1999. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 175, 327-335.

Bhaskar, T.I.C., Ali, S.A., 1984. Studies on the protein requirements of postlarvae of the penaeid prawn *Penaeid indicus* H. Milne Edwards, using purified diets. *Indian J. Fish.* 31, 74– 81.

Bogard, J. R., Thilsted, S. H., Marks, G.C., Wahab, Md. A., Hossain, M.A.R., Jakobsen, J., Stangoulis, J., 2015. Nutrient composition of important fish species in Bangladesh and potential contribution to recommended nutrient intakes. *J. Food Compos. Anal.* 42, 120-133.

Boonyaratpalin, M., New, M.B., 1982. Evaluation of diets for *Macrobrachium rosenbergii* reared in concrete ponds. In: New, M.B. (Ed.), *Giant Prawn*

- Farming. Elsevier Science Publ. Corp., Amsterdam, Oxford, New York, pp. 249–256.
- Boyd, C.L., 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Birmingham Publishing Co., Birmingham, AL, 482 pp.
- Brand, C., Colvin, L., 1977. Compounded diets for early postlarval *Penaeus californiensis*. Proceeding of the annual meeting - World Mariculture Society 8, 811-820.
- Brand, C.W., Colvin, L.B., 1977. Compounded diets for early postlarval *Penaeus californiensis*. Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society 8, 811-820.
- Boyd, C. E., Clay, J. W., 1998. Shrimp aquaculture and the environment. Scientific American 42-49.
- Briggs, M.R.P., Jauncey, K., Brown, J.H., 1988. The cholesterol and lecithin requirements of juvenile prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) fed semi-purified diets. Aquaculture 70, 121 – 129.
- Brugère, C., Ridler, N., 2004. Global aquaculture outlook in the next decades: An analysis of national aquaculture production forecasts to 2030. FAO Fisheries Circular No. 1001, FAO, Rome, pp. 47. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/007/y5648e/y5648e00.HTM>.
- Buchanan, J., Sarac, H.Z., Poppi, D., Cowan, R.T., 1997. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. Aquaculture 151, 29-35.
- Bulbul, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Abdul Kader, M., 2015. Growth performance of juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Bate) fed diets replacing fishmeal with soybean meal. Aquacult. Res. 46, 572-580.
- Bulbul, M., S. Koshio, Ishikawa, M., Yokoyama, S., Abdul Kader, Md. 2015. Growth performance of juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Bate) fed diets replacing fishmeal with soybean meal. Aquacult. Res. 46, 572-580.
- Bureau, D.P., Gunther, S.J., Cho, C.Y., 2003. Chemical composition and preliminary theoretical estimates of waste outputs of rainbow trout reared on commercial cage culture operations in Ontario. N. Am. J. Aquacult. 65, 33 – 38.
- Bureau, D.P., Kaushik, S.J., Cho, C.Y., 2002. Bioenergetics. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp. 1 – 56.
- Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S. J., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K. A., Kühn, E. R., Quinsac, A., Krouti, M., Ribaillet, D., 2000. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilization and thyroid status. Aquaculture 188, 363-382.
- Camara, M.R., 1994. Dietary phosphatidylcholine requirements of *Penaeus japonicus* Bate and *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) (Doctoral dissertation). University of Ghent, Belgium.
- Carrillo, O., González, R., 1998. Control de la digestión en camarones. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y

- Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B. C. S., México.
- Castell, J.D., Covey, J.F., 1976. Dietary lipid requirements of adult lobsters, *Homarus americanus* (M.E.). J. Nutr. 106, 1159 – 1165 .
- Castell, J.D., Mason, E.G., Covey, J.F., 1975. Cholesterol requirements of juvenile American lobster (*Homarus americanus* ). J. Fish. Res. Board Can. 32, 1431–1435.
- Castille, F., Lawrence, A., Buisman, P., Drost, R., 2004. Effects of sterol supplements (cholesterol FG, cholesterol SF, and sterols M1M) on growth and survival of the shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16–19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México, pp. 504–517.
- Catacutan, M.R., 1991. Apparent digestibility of diet with various carbohydrate levels and the growth response of *P. monodon*. Aquaculture 95, 89 – 96.
- Chamberlain, G.W., 1993. Aquaculture trends and feed projections. J. World Aqua. 24, 19- 29.
- Chauhan, G.S., Eskin, N.A.M., Mills, P.A., 1999. Effect of saponin extraction on the nutritional quality of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) proteins. Journal of Food Science and Technology 36, 123-126.
- Chen, H.Y., Len, Y.T., Roelants, I., 1992. Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon* using microencapsulated arginine. Mar. Biol. 114, 229 – 233.
- Chen, H.Y., Jenn, J.S., 1991. Combined effects of dietary phosphatidylcholine and cholesterol on the growth, survival and body lipid composition of marine shrimp, *Penaeus penicillatus*. Aquaculture 96, 167 – 178.
- Chen H.Y., 1993 Requirements of marine shrimp, *Penaeus monodon*, juveniles for phosphatidylcholine and cholesterol. *Aquaculture* 109, 165–176.
- Chen, J.-C., Chen, K.-W., 1997. Oxygen uptake and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* during depuration following one-day exposure to different concentrations of saponin at different salinity levels. *Aquaculture* 156, 77-83
- Chen, J.-C., Chen, K.-W., Chen, J.-M., 1996. Effects of saponin on survival, growth, molting and feeding of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 144, 165-175.
- Cheng, Z. J., Behnke, K.C., Dominy, W.G., 2002a. Effects of poultry by-product meal as a substitute for fish meal in diets on growth and body composition of juvenile pacific white Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture* 12, 71-83.
- Cheng, Z. J., Behnke, K.C., Dominy, W.G., 2002b. Effect of feather meal on growth and body composition of the juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture* 12, 57-69.

- Chookird, D., Tantikitti, C., Pongdara, A., Srichanun, M., 2010. Effect of hemoglobin powder substituted for fishmeal on growth performance, protein digestibility, and trypsin gene expression in *Litopenaeus vannamei*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 32, 119-127.
- Colvin, L.B., Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment systems. Proc. World Maricult. Soc. 8, 821 – 840.
- Colvin, L.B., Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment systems. Proc. World Maricult. Soc. 8, 821 – 840.
- Colvin, P.M., 1976. Nutritional studies on penaeid prawns: protein requirements in compounded diets for juvenile *Penaeus indicus* (Milne Edwards). Aquaculture 7, 315 – 326.
- Coon, C.N., Leske, K.L., Akavanichan, O., Cheng, T.K., 1990. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fibre digestion in adult roosters. Poultry Science 69, 787– 793.
- Cousin, M., Cuzon, G., Guillaume, J., Aquacop, 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: *in vivo* and *in vitro* study on eight samples of various origin. Aquaculture 140, 361 – 372.
- Cousin, M., Cuzon, G., Blanchet, E., Ruelle, F., Aquacop, 1993. Protein requirements following and optimum dietary energy to protein ratio for *P. vannamei* juveniles. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish nutrition in practice (France), June 24–27, 1991, INRA Paris, France, pp. 599–606.
- Cousin, M., Cuzón, G., Blandrit, E., Ruelle, F., AQUACOP, 1991. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *Penaeus vannamei* juveniles. In: Kaushik, Luquet, P. (Eds.), Fourth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, France, June 24–27, 1991, Colloq. INRA, vol. 6, pp. 599–606.
- Coutteau, P., Camara, M.R., Sorgeloos, P., 1996. The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance, and fatty acid composition of postlarval *Penaeus vannamei*. Aquaculture 147, 261 – 273.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. Aquaculture 155, 149 – 164.
- Cowey, C.B., 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. Aquaculture 124, 1 – 11.
- Cowey, C.B., Cho, C.Y., 1993. Nutritional requirements of fish. Proc. Nutr. Soc. 52, 417 – 426.
- Cruz-Suárez, L. E., Nieto-López, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U., Ricque-Marie, D., 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. Aquaculture 272, 466-476.



- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.M., Hackling, D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum Sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196, 87-104.
- Cummins, V. C., Webster, C. D., Thompson, K. R., Velasquez, A. 2013. Replacement of fish meal with soybean meal, alone or in combination with distiller's dried grains with solubles in practical diets for pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, grown in a clear-water culture system. *Journal of the World Aquaculture Society* 44, 775-785.
- Cusack, D.F., 1984. Quinoa: grain of the Incas. *The Ecologist* 14, 21-30.
- D'Abramo, L., Bordner, C., Conklin, D., Baum, N., 1984. Sterol requirement of juvenile lobsters, *Homarus sp.* *Aquaculture* 42, 13 – 25.
- D'Abramo, L., Daniels, W., 1994. Sterols requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Abstracts of World Aquaculture'94. New Orleans. World Aquaculture Society , Baton Rouge, LA , p. 200.
- D'Abramo, L.R., Bordner, C.E., Conklin, D.E., 1981. Essentiality of dietary phosphatidylcholine for the survival of juvenile lobsters. *J. Nutr.* 111, 425 – 431.
- D'Abramo, L.R., Bordner, C.E., Conklin, D.E., 1982. Relationship between dietary phosphatidylcholine and serum cholesterol in the lobster *Homarus sp.* *Mar. Biol.* 67, 231 – 235.
- D'Abramo, L.R., Sheen, S.-S., 1993. Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 115, 63 – 86.
- D'Abramo, L.R., Wright, J.S., Wright, K.H., Bordner, C.E., Conklin, D.E., 1985 . Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifasticus leniusculus*. *Aquaculture* 49, 245 – 255.
- D'Abramo, L. R., Lovell, R. T., 1991. Aquaculture research needs for the year 2000: fish and crustacean nutrition. *World Aquaculture* 22, 57-62.
- D'Abramo, L.R., 1998. Nutritional requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Comparisons with species of penaeid shrimp . *Rev. Fish. Sci.* 6, 153 – 163.
- Davis D.A., Arnold C.R., McCallum, I., 2002. Nutritinal value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.* 8, 87-94.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *P. vannamei*. *Aquaculture* 114, 285 – 292.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.* 8, 87-94.
- Dayal, J. S., Rajaram, V., Ambasankar, K., Ali, S.A., 2011. Sunflower oil cake as a replacement for fish meal in feeds of Tiger shrimp, *Penaeus monodon* reared in tanks and in net cages. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 40, 460-470.

- De la Higuera, M., Garcia-Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suarez, M.D., Moyano, F.J., 1988. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 71, 37–50.
- Deshimaru, O., Kuroki, K., 1974a. Studies on a purified diet for prawn II. Optimum contents of cholesterol and glucosamine in the diet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 40, 421 – 424.
- Deshimaru, O., Yone, Y., 1978. Optimum level of dietary protein for prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 1395 – 1397.
- Deshimaru, O., Kuroki, K., 1974b. Studies on a purified diet for prawn. I. Basal composition of the diet. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 40, 413 – 419.
- Dominy, W.G., Ako, H., 1988. The Utilization of Blood Meal as a Protein Ingredient in the Diet of the Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 70, 289-299.
- Duerr, E.O., Walsh, W.A., 1996. Evaluation of cholesterol additions to a soyabean meal-based diet for juvenile Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in an outdoor growth trial. *Aquacult. Nutr.* 2, 111 – 116.
- Dumas, A., France, J., France, J., 2008. Mathematical modelling in animal nutrition: a centenary review. *J. Agric. Sci.* 146, 123 – 142.
- Duranti M., Consonni A., Magni C., Sessa F., Scarafoni A., 2008. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science and Technology* 19, 624-633.
- Durruty, C., Maldonado, L., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., 2000. Requerimientos de proteína dietética en larvas de *Litopenaeus setiferus* y *L. vannamei* . En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, D., Gaxiola-Cortés y, G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3–6 November, Cancún, México.
- Durruty, C., Maldonado, L., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., 2000. Requerimientos de proteína dietética en larvas de *Litopenaeus setiferus* y *L. vannamei* . En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, D., Gaxiola-Cortés y, G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3–6 November, Cancún, México.
- Espinoza, M., 2013. Digestibilidad *in vitro* de diferentes fuentes proteicas usando enzimas específicas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Master, Universidad Politécnica de Valencia, 22 pp.
- Eusebio, P.S., 1991. Effect of dehulling on the nutritive value of some leguminous seeds as protein sources for tiger prawn *Penaeus monodon* juveniles. *Aquaculture* 99, 297-308.
- FAO 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome. pp. 223.
- FAO 2015. *Food Outlook. Biannual report on global food markets*. pp.133

- Feng, Z., Dong, C., Wang, L., Hu, Y., Zhu, W., 2013. Optimal content and ratio of lysine to arginine in the diet of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. Chin. J. Oceanol. Limnol. 31, 789 – 795.
- Fenucci, J.L., Lawrence, A.L., Zein-Eldin, Z.P., 1981. The effects of fatty acid and shrimp meal composition of prepared diets on growth of juvenile shrimp, *Penaeus stylirostris*. J. World Maricult. Soc. 12, 315 – 324.
- Fernández, R.R., Lawrence, A.L., 1988. The nutritional responses of three species of postlarval shrimp to cottonseed meal. J. World Maricult. Soc., 19:30A
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A.-M., Bergot, P., 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture 161, 213 – 223.
- Forster, I.P., Dominy, W.G., Obaldo, L.G., Hartnell, G.F., Sanders, E.F., Hickam, T.C., Ruebelt, M.C., 2011. The effect of soybean oil containing stearidonic acid on growth performance, n-3 fatty acid deposition and sensory characteristics of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquacult. Nutr. 17, 200 – 213.
- Forster, I.P., Dominy, W., Obaldo, L., Tacon, A.G.J., 2003. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture 219, 655–670.
- Foster J.R., Gabbot P.A., 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom 51, 943-961.
- Fox, J. M., Humes, M., Davis, D.A., Lawrence, A., 2011. Evaluation of methionine supplements and their use in grain-based feeds for *Litopenaeus vannamei*. J. World Maricult. Soc. 42, 676-686.
- Fox, J. M., Lawrence, A. L., Li-Chan, E. 1995 Dietary requirements for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. Aquaculture 131, 279-290.
- Fox, J. M., Lawrence, A. L., Li-Chan, E., 1995. Dietary requirements for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. Aquaculture 131, 279-290.
- Fox, J.M., Davis, D.A., Wilson, M., Lawrence, A.L., 2006. Current status of amino acid requirement research with marine penaeid shrimp. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-Lopez, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Puello-Cruz, A.C., Garcia-Ortega, A. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola, vol. VIII, pp. 182–196.
- Fox J.M., Lawrence A.L., Patnaik S., Forster I., Ju Z.Y., Dominy W., 2010 Estimation of feed level of methionine by *Litopenaeus vannamei* (Boone) using covalently attached and crystalline sources in low-protein semi-purified diets. In: Avances en Nutrición Acuícola X. Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (ed. by L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Nieto-López, D.A. Villarreal-Cavazos & D. Gamboa), pp. 232–249. San Nicolás de la Garza, Monterrey, México.

- Fraga, I., Alvarez, J.S., Galindo, J., 1992. Requerimientos nutricionales y respuesta a varias relaciones proteína/energía en juveniles de camarón blanco *Penaeus schmitti*. Result. Invest. Pesqueras 16, 13 – 20.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. British Journal of Nutrition 88, 587-605.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture 199, 197-227.
- Galindo, J., Fraga, I., Arazoza, M., Alvarez, J., Ramos, D., González, R., 2002. Requerimientos nutricionales de juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*): evaluación de dietas prácticas. CIVA, 84–94. <<http://www.civa2002.org>>.
- Galindo, J., Fraga, I., Artilles, M., Arazoza, M., Alvarez, J., Pelegrin, E., 2003. Efecto de niveles de proteína en la dieta sobre el crecimiento de juveniles de camarón rosado (*Farfantepenaeus notialis*). CIVA, 575–586. <<http://www.civa2003.org>>.
- Galway, N.W., Leakey, C.L.A., Price, K.R., Fenwick, G.R., 1990. Chemical composition and nutritional characteristics of quinoa. Food Science and Nutrition 4, 245-261.
- García-Galano, T., 2006. Proteínas. En: Rosas, C., Carrillo, O., Wilson, R., Andreatta, E.R. (eds). Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica. Subprograma II “Acuicultura” Red Temática II.C. CYTED. pp 128-142. Mexico.
- García, T., Galindo, J., 1990. Requerimientos de proteína en las postlarvas de camarón blanco *Penaeus schmitti*. Rev. Inv. Mar. 11, 247 – 250.
- García, T., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., Soto, L., López, N., Rosas, C., 1998. Influencia de las proteínas dietéticas sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de las postlarvas del camarón blanco (*Penaeus setiferus*) y del camarón rosado (*P. duorarum*) del Golfo de México. Aquatic 2 <<http://aquatic.unizar.es>>.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquacult. Res. 38, 551–579.
- Gaxiola, G., Cuzon, G., García, T., Taboada, G., Brito, R., Chimal, M.E., Paredes, A., Luis Soto, L., Carlos Rosas, C., van Wormhoudt, A., 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 140, 29– 39.
- Gaylord, T.G., Barrows, F.T., Rawles, S.D., Liu, K., Bregitzer, P., Hang, A., Obert, D.E., Morris, C. 2009. Apparent digestibility of nutrients and energy in extruded diets from cultivars of barley and wheat selected for nutritional quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquacult. Nutr. 15, 306 – 312.

- Geurden, I., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1995a. Dietary phospholipids and body deformities in carp *Cyprinus carpio* L. larvae Lavens , P. Jaspers , E. Roelants , I. (Eds.), Larvi '95 – Fish and Shellfish Symposium, Gent, Belgium. EAS Spec. Publ., vol. 24 . European Aquaculture Society, pp. 162 – 165.
- Geurden, I., Radünz-Neto, J., Bergot, P., 1995b. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 131, 303 – 314.
- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Cahu, C., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40, 609– 618.
- Glencross, B. D., 2001. Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Grains Research Council (GRC) of WA Project “Assessment of the nutritional variability of W.A lupins as an aquaculture feed ingredient”. Department of Fisheries. Research Division. Government of Western Australia. Fisheries Western Australia. 126pp.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., 1999. The dietary linoleic and linolenic fatty acids requirements of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.* 5, 53 – 63.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., 2001a. Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.* 7, 101–112.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., 2001b. A study of the arachidonic acid requirements of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.* 7, 59–69.
- Glencross, B., Smith, D., Thomas, M., Williams, K., 2002. The effect of dietary n-3 and n-6 fatty acid balance on the growth of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.* 8, 43– 51.
- Glencross, B.D., Boujard, T., Kaushik, S.J., 2003. Influence of oligosaccharides on the digestibility of lupin meals when fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 219, 703–713.
- Glencross, B., Evans, D., Rutherford, N., Hawkins, W., McCafferty, P., Dods, K., Jones, B., Harris, D., Morton, L., Sweetingham, M., Sipsas, S., 2006. The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture* 253, 512-522.
- Glencross, B.D., Hawkins, W., Maas, R., Karopoulos, M., Hauler, R., 2010. Evaluation of the influence of different species and cultivars of lupin kernel meal on the extrusion process, pellet properties and viscosity parameters of salmonid feeds. *Aquacult. Nutr.* 16, 13–24.
- Glencross, B.D., Hien, T.T.T., Phuong, N.T., Cam Tu, T.L., 2011. A factorial approach to defining the energy and protein requirements of Tra catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquacult. Nutr.* 17, e396 – e405.
- Goff, J.B., Gatlin, D.M. III, 2004. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine. *Aquaculture* 241, 465–477.

- Gomes, E., Rema, P., Sadasivam J., Kaushik, 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177-186
- Gong, H., Jiang, D., Lawrence, A.L., González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M., 2004a. Nuevos avances en el estudio de fosfolípidos nutrimentales para camarón. En Cruz Suárez, L.E., Rique Marie, D., Nieto Lopez, M.G., Villareal, D. Scholz, U. and González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México, 329-343.
- Gong, H., Jiang, D., Lightner, D.V., Collins, C., Brock, D., 2004b. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquacult. Nutr.* 10, 227 – 236.
- Gong, H., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M., Jiang, D.H., Zhang, F., 2001. Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplemented in semipurified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquacult. Nutr.* 7, 11 – 17.
- Gong, H., Lawrence, A.L., Jiang, D.-H., Castille, F.L., Gatlin III, D.M., 2000. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. *Aquaculture* 190, 305 – 324.
- González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Pérez Velázquez, M., 2002 a. Effect of various dietary lipid levels on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 33, 330 – 340.
- González Félix , M.L., Lawrence , A.L., Gatlin III , D.M., Pérez Velázquez , M., 2002 b. Growth survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids . *Aquaculture* 205, 325 – 343.
- González Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Pérez Velázquez, M., 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid. *Aquacult. Nutr.* 9, 115 – 122.
- Gouveia, A., Davies, S.J., 1998. Preliminary evaluation of pea seed meal (*Pisum sativum*) for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 166, 311-320.
- Guillaume, J., Ceccaldi, H.J., 2001. Digestive physiology of shrimps. In: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*, INRA Editions. Springer-Praxis, Chichester, UK, pp. 239 – 263.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R., 2001. *Nutrition and Feeding of fish and Crustaceans*. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. pp 1-408.
- Gutiérrez-Espinosa, M. C., Yossa-Perdomo, M. I., 2011. Apparent digestibility of dry matter , protein and energy regarding fish meal , poultry by-product meal and quinoa for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Orinoquia* 15, 169–179.

- Hajra, A., Ghosh, A., Mandal, S.K., 1988. Biochemical studies on the determination of optimum dietary protein to energy ratio for tiger prawn, *Penaeus monodon* (Fab.), juveniles. *Aquaculture* 71, 71 – 79
- Hanel, R., Broekman, D., de Graaf, S., Schnack, D., 2007. Partial replacement of fishmeal by liophylized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in Pacific white shrimp diets. *The Open Marine Biology Journal* 1, 1-5.
- Hardy, R. W., Matsumoto, T., 1991. Specifications for marine by-products for aquaculture. Pp. 99-108 in D. M. Akiyama and R. K. H. Tan, editors. *Proceedings of the Aquaculture feed processing and Nutrition Workshop*. American Soybean Association, Singapore, Republic of Singapore.
- Hardy, R.W. 1999. Alternate Protein Sources. *Feed Management*. 50: 25-28.
- Harrison, K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 9, 1 – 28.
- Hemre, G.-I., Mommsen, T.P., Krogdahl, Å., 2002 . Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.* 8, 175 – 194.
- Hernández, C., Olvera-Novoa, M.A., Aguilar-Vejar, K., González-Rodríguez, B., Abdo de la Parra, I., 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 277, 244-250.
- Hew, M., Cuzon, G., 1982. Effect of dietary lysine and arginine levels, and their ratio, on the growth of *Penaeus japonicus* juveniles. *J. World Maricult. Soc.* 13, 154.
- Hidalgo, L.E., Taboada, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Mascaró, M., Jones, D., Simoes, N., 2000. Requerimiento proteico relativo de juveniles de camarón rojo del Caribe, *Farfantepenaeus brasiliensis* (La Treille 1817), en un sistema cerrado de recirculación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, D., Olvera y, M., Civera, R., (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, November 19–22, 2000, Mérida, México.
- Hilton, J.W., Harrison, K.E., Slinger, S.J., 1984. A semi-purified test diet for *Macrobrachium rosenbergii* and the lack of need for supplemental lecithin. *Aquaculture* 37, 209 – 215.
- Houser, R.H., Akiyama, D.M., 1997. Feed formulation principles. En: D'Abramo, L.R. Concklin, D.E. Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*, vol. 6. World Aquaculture Society, pp. 493 – 519. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Hua, K., 2013. Investigating the appropriate mode of expressing lysine requirement of fish through non-linear mixed model analysis and multilevel analysis. *Br. J. Nutr.* 109, 1013 – 1021.
- Improta, F., Kellems, R.O., 2001. Comparison of raw, washed and polished quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) to wheat, sorghum or maize based diets on

growth and survival of broiler chicks. *Livestock Research for Rural Development. Volume 13, Article #1*. Retrieved September 22, 2014, from <http://www.lrrd.org/lrrd13/1/impr131.htm>

Jackson, A., Shepherd, J. 2010. Connections between farmed and wild fish: fishmeal and fish oil as feed ingredients in sustainable aquaculture. In *Advancing the Aquaculture Agenda: Workshop Proceedings*. Paris, 15–16 April 2010. Paris: OECD Publishing.

Jackson, A., 2012. Fishmeal & fish oil and its role in sustainable aquaculture. *International Aquafeed* 15, 18–21.

Joslyn M.A., Goldstein, J.L. 1964. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Advances in Food Research* 13, 179–217.

Ju, Z.Y., Forster, I.P., Dominy, W.G., 2009. Effect of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulate diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292, 237-234.

Kabuage, L.W., P.N. Mbugua, B.N. Mitaru, T.A. Ngatia. 1996. Effect of steam pelleting and inclusion of molasses in amaranth diets on broiler chicken performance, carcass composition and histopathology of some internal organs. [www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/550](http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/550)

Kai, H., Kanazawa, A., 1989. Optimum contents of cholesterol in the purified diet for grass prawn *Penaeus monodon*. *Abst. 2nd Asian Fish. Forum, Asian Fish. Soc., Japan*. 68.

Kanazawa, A., 1983. Penaeid nutrition. In: Pruder, G.D., Conklin, D.E., Langdon, C. (Eds.), *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University, Division of Continuing Education, Baton Rouge, LA.

Kanazawa, A., 2001. Sterols in marine invertebrates. *Fish. Sci.* 6, 997 – 1007.

Kanazawa, A., Tanaka, N., Teshima, S., Kashiwada, K., 1971a. Nutritional requirements of prawn-II: Requirements for sterols. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 37, 211 – 215.

Kanazawa, A., Tanaka, N., Teshima, S., Kashiwada, K., 1971b. Nutritional requirements of prawn-III: Utilization of dietary sterols. *Nippon Suisan Gakkaishi* 37, 1015 – 1019.

Kanazawa, A., Teshima, S., Endo, M., Kayama, M., 1978. Effects of eicosapentaenoic acid on growth and fatty acid composition of the prawn. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 27, 35 – 40.

Kanazawa, A., Teshima, S., Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39 – 49.

Kanazawa, A., Tokiwa, S., Kayama, M., Hirata, M., 1977. Essential fatty acids in the diet of prawn. I. Effects of linoleic and linolenic acids on growth. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43, 1111– 1114.

Kanazawa, A., 1993. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice. IV International*



Symposium on Fish Nutrition and Feeding, INRA, France National Institute for Agricultural Res., pp. 519 – 530.

Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155, 129 – 134.

Kanazawa, A., Teshima, S., Tokiwa, M., Kayama, Hirata, M., 1979a. Essential fatty acids in the diet of prawn-II. Effect of docohexaenoic acid on growth. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 1151 – 1153.

Kanazawa, A.S., Teshima, S., Tokiwa, M., Endo, M., Abdel Razek, F.A., 1979b. Effects of short-necked clam phospholipids on the growth of the prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 961 – 965.

Kasper, C.S., Brown, P.B., 2003. Growth improved in juvenile Nile tilapia fed phosphatidylcholine. *N. Am. J. Aquacult.* 65, 39 – 43.

Kaushik, S.J., Fauconneau, B., 1984. Effects of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A* 79, 459– 462.

Kean, J.C., Castell, J.D., Bogen, A.G., D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., 1985. A re-evaluation of the lecithin and cholesterol requirements of juvenile lobster (*Homarus americanus*) using crab protein-based diets. *Aquaculture* 47, 143 – 149.

Kim, K.I., Grimshaw, T.W., Kayes, T.B., Amudson, C.H., 1992a. Effect of fasting or feeding diets containing different levels of protein or amino acids on the activities of the liver amino acid and degrading enzyme and amino acid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) . *Aquaculture* 107, 89 – 105.

Kim, K.-I., Kayes, T.B., Amundson, C.H., 1992b. Requirements for lysine and arginine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 106, 333 – 344.

Kim II, K., Kayes, T.B., Amundson, C.H., 1991. Purified diet development and re-evaluation of the dietary protein requirement of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96, 57 – 67.

Kohler, C., Krueger, S., 1985. Use of pressed brewer's grains as feed for freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of the World Mariculture Society* 16, 181-182.

Koziol, M. J., 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis* 5, 35– 68.

Krossøy, C.R., Waggbø, P.G., Ørnsrud, R., 2011. Vitamin K in fish nutrition. *Aquacult. Nutr.* 17, 585 – 594.

Kumar, R. R., S. Bandyopadhyay 1999. A comparative study of shrimp feed pellets processed through cooking extruder and meat mincer. *Aquaculture Engineering* 19, 71-79.

Kureshy, N., Davis, D.A., 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204, 125–143.

Lall , S.P., 2002. The minerals. In: Halver , J.E. , Hardy , R.W. (Eds.), *Fish Nutrition* , third ed. Academic Press , San Diego, CA , pp. 259 – 308.

- Lawrence, A.L., Houston, D .M., 1993. Nutritional response of juvenile *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* to different quality feeds in the presence and absence of natural productivity. Pages: 113-124. In: McVey, J.P., Collie, M. (Eds) Proceedings 20th US-JAPAN Symposium on Aquacult. Nutrition.
- Lawrence, A., Castillo, F.L., Sturner, L.N., Akiyama, D., 1986. Respuesta nutricional de los camarones marinos a diferentes niveles de harina de soya integral en alimentos balanceados. Conferencia de Negocios conjuntos, 22.
- Lim, C., Cuzon, G., 1994. Water stability of shrimp pellet, a review. Asian Fish. Sci. 7, 115–127.
- Moss, S. M., Divakaran, S., Kim, B.G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquacult. Res. 32, 125-131.
- Lee, D.L., 1971. Studies on the protein utilization related to growth in *Penaeus monodon*. Aquaculture 1, 1-13.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1985. Effect of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* . Proc. World Maricult. Soc. 16, 275 – 287.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. In: D'Abramo , L.R. Concklin , D.E. Akiyama , D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, vol. 6. World Aquaculture Society, pp. 194 – 260. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lehman, J., 1988. Carbohydrates of amaranth. Legacy 1, 4-8. American Amaranth Institute Bricelyn, MN.
- Lemos, D., Lawrence, A.L., Siccardi, A.J., 2009. Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by in vitro pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 295, 89-98.
- Lester, R., Care, M., Little, J., Cooperstein, L., Dowd, S., 1975. Crustacean intestinal detergent promotes sterol solubilization. Science 189, 1098 – 1100.
- Lim C., Dominy W., 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 87, 53-63.
- Lim C., Dominy W., 1991. Utilization of plant proteins by warm water fish. In: Akiyama, D.M., Tan, R.K.H. (Eds.), Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop, September 19-25. American Soybean Association, Singapore, pp. 245-251.
- Lim, C., Cuzon, G., 1994. Water stability of shrimp pellet, a review. Asian Fish. Sci. 7, 115–127.
- Lim, C., 1996. Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. Journal of World Aquaculture Society 27, 402-409.
- Lim, C., Beames, R.M., Eales, J.G., Prendergast, A.F., Mclesse, J.M., Shearer, K.D. Higgs, D.A. 1997. Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquacult. Res. 3, 269-279.

- Liu, F.-J., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Li, X.-F., Zhang, Z.-H., Yang, H.-J., Du, Z.-Y. 2014a. Quantitative dietary isoleucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquacult. Int.* 22, 1481 – 1497.
- Liu, F.-J., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Chen, W.-D., Yang, H.-J., Du, Z.-Y., 2014b. Quantitative dietary leucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquacult. Nutr.* 20, 332 – 340.
- Liu, Y.J., D.H. Liu, J. Feng, Tian, L.X., 2000. Soy protein concentrate can efficiently replace fishmeal in tiger shrimp feeds. Research report Fish Nutrition Laboratory, Zhongshan University, R.P. China.
- Lorenz K., Wright, B., 1984 Phytate and Tannin Content of Amaranth. *Food Chemistry* 14, 27-34.
- Mambrini, M., Guillaume, J., 2001. Protein nutrition. In: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*, INRA Editions. Springer-Praxis, Chichester, UK, pp. 81 – 109.
- Marchiori, M., Magalhaes, C.V., Yunes, J.S., Levy, J.A. 1982. Studies on artificial feeding of *Penaeus paulensis*. *Atlantica* 5, 43-48.
- Martínez-Rocha, L., Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., Cruz-Suarez, L.E., 2012. Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquacult. Res.* 44, 847-859.
- Mbahinzireki, G.B., Lee, K.J., El-Saidy, D., Wisner, E.R., 2001. Growth, feed utilization and body composition of tilapia (*Oreochromis sp.*) fed with cottonseed mealbased diets in a recirculating system. *Aquacult. Nutr.* 7, 189-200.
- McCallum, I., W. Newell, L.E. Cruz-Suárez, D.R. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, A. Davis, D. Thiessen, L. Campbell, A.O. Meyer-Willerer, C. Phillips, y D. Hickling. 2000. Uso de arvejón (feed pea, chicharo) *Pisum sativum* en alimentos para camarones *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei*, tilapia (*Oreochromis niloticus*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*) In: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa, y R. Civera-Cerecedo. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre. Mérida, Yucatán, México.*
- McCurdy, S.M., March, B.E., 1992. Processing of canola meal for incorporation in trout and salmon diets. *JAOC* 69, 213-220.
- McGinnis, A.J., Kasting, R., 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. *Agricultural and Food Chemistry* 12, 259-262.
- Médale, F., Poli, J.M., Vallée, F., Blanc, D., 1999. Utilization of a carbohydrate-rich diet by common carp reared at 18 and 25°C. *Cybum* 23, 139 – 152.
- Mendoza, R., A. De Dios, Vazquez, C., Cruz, E., Ricque, D., Aguilera, C., Montemayor, J., 2001. Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquacult. Nutr.* 7, 143-151.

- Mente, E., D. Houlihan, Davidson, I., Sorgeloos, P., Coutteau, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J. Exp. Biol.* 205, 3107-3122.
- Merican, Z.O., Shim, K.F., 1997. Quantitative requirements of linolenic and docosahexaenoic acid for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 157, 277-295.
- Millamena, O.M., Bautista, M., Reyes, O., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 151, 9 – 14.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Kanazawa, A., 1996a. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 143, 403 – 410.
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N., Kanazawa, A., 1996b. Valine requirement of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Nutr.* 2, 129 – 132.
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. *Aquaculture* 164, 95 – 104.
- Millamena, O.M., Teruel, M.B., Kanawaza, A., Teshima, S., 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp. *Penaeus monodon* , for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture* 179, 169 – 179.
- Millamena, O.M., Bautista, M., Reyes, O., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 151, 9 – 14.
- Millikin, M.R., Fortner, A.R., Fair, P.H., Sick, L.V., 1980. Influence of dietary protein concentration on growth, feed conversion and general metabolism of juvenile prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Proc. World Maricult. Soc.* 11, 382 – 391.
- Molina-Poveda, C., Gómez, G., 2002. Digestibility of different carbohydrates in the diet of the juvenile *Litopenaeus vannamei*. *World Aquaculture Society*, (book of abstracts). pp. 518. Beijing, China.
- Molina-Poveda, C., Morales, M.E., 2004. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Res.* 35, 1158-1165.
- Montero-Quintero K., Molina, E., Sánchez-Urdaneta, A.B. 2011. Chemical composition of *Amaranthus dubius*: an alternative for human and animal feeding. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* 28, 619–627.
- Moon, H.Y., Gatlin, D.M. III, 1991. Total sulfur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 95, 97–106.
- Morales, A. E., G. Cardenete, M. De la Higuera, Sanz, A., 1994. Effect of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124, 17-1 26.

- Morris, T., Samocha, T.M., Davis, D., 2011. Cholesterol supplements for *Litopenaeus vannamei* reared on plant based diets in the presence of natural productivity. *Aquaculture* 314, 140 – 144.
- Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 187, 175-191.
- Moss, S. M., Divakaran, S., Kim, B.G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Res.* 32, 125-131.
- Muzquiz, M., Cuadrado, C., Ayet, G., de la Cuadra, C., Burbano, C., Osagie, A., 1994 Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. *J. Agrlc. Food Chem.* 42, 1447-1450.
- Niu, J., Chen, P.-F., Tian, L.-X., Liu, Y.-J., Lin, H.-Z., Yang, H.-J., Liang, G.Y., 2012a. Excess dietary cholesterol may have an adverse effect on growth performance of early post-larval *Litopenaeus vannamei*. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 3, 19.
- Niu, J., Lin, H.-Z., Jiang, S.-G., Chen, X., Wu, K.-C., Tian, L.-X., Liu, Y.-J., 2012b. Effect of seven carbohydrate sources on juvenile *Penaeus monodon* growth performance, nutrient utilization efficiency and hepatopancreas enzyme activities of 6-phosphogluconate dehydrogenase, hexokinase and amylase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174, 86 – 95.
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Animal Nutrition Series National Research Council of the National Academies. The National Academies Press, Washington, DC, 376 pp.
- Nunes, A.J.P., do Carmo, M.V. and Sá, Neto, H.S., 2010. Meeting the challenge of no fishmeal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*: case studies from Labomar, Brazil. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 485-501.
- Nunes, A.J.P., Sá, M.V.C., Browdy, C.L., Vazquez-Anon, M., 2014. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture* 431, 20 – 27.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Kaino, T., Ringø, E., 1999. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 35-44.
- Olsen, R.E., Ringø, E., 1997. Lipid digestibility in fish: a review. *Recent Res. Dev. Lipids Res.* 1, 199 – 265.
- Olsen, J. 2002. Quinoa quinoa saponina chenopodium seed is high in protein, calcium and iron. <http://www.ccbol.com/quinoaTodo.html>

- Paibulkichakui, C., Piyatiratitivorakul, S., Kittakpp, P., Vorsnop, V., Fast, A.W., Menasveta, P., 1998. Optimal dietary levels of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae. *Aquaculture* 167, 273 – 281.
- Paripatananont, T., Boonyaratpalin, M., Pengsen, P., Chotipunntu, P., 2001. Substitution of soy protein concentrate for fishmeal in diets of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquacult. Res.* 32 (Suppl. 1), 369-374.
- Pauly, D., Froese, R., 2012. Comments on FAO's State of Fisheries and Aquaculture, or "SOFIA 2010". *Marine Policy* 36, 746–752.
- Pavan Kumar, B., Ramudu, K.R., Devi, B.Ch., 2014. Mini review on Incorporation of cotton seed meal, an alternative to fish meal in aquaculture feeds. *International Journal of Biological Research* 2, 99-105.
- Pedersen, B., Hallgren, L., Hansen, I., Eggum, B.O., 1987a. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 2. As a supplement to cereals. *Plant Foods for Human Nutrition* 36, 325-334.
- Pedersen, B., Kalinowski, L.S., Eggum, B.O., 1987b. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 1. Protein and minerals of raw and processed grain. *Plant Foods for Human Nutrition* 36, 309-324.
- Pedrazzoli, A., Molina, C., Montoya, N., Townsend, S., Leon-Hing, A., Paredes, Y., Calderón, J., 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Rev. Fish. Sci.* 6, 143 – 151.
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Villacrés, E., Rivera, M., Subia, C., 2009. Catalogo de variedades mejoradas de granos andinos: Chocho, Quinua y Amaranto, para la sierra del Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. Publicacion Miscelanea No. 151. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA). Estación Experimental Santa Catalina, INIAP. Quito, Ecuador. 24pp.
- Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2003. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquacult. Res.* 34, 1111–1117.
- Petriella, A.M., Muller, M.I., Penucci, J.L., Saez, M.B., 1984. Influence of dietary fatty acids and cholesterol on the growth and survival of the Argentine prawn, *Artemesia longinaris* Bate. *Aquaculture* 37, 11 – 20.
- Petterson, D.S., 2000. The use of lupins in feeding systems-review. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 13, 861–882.
- Piedad-Pascual, F., Cruz, E. M., Sumalangcay, Jr. A., 1990. Supplemental feeding of *Penaeus monodon* juveniles with diets containing various levels of defatted soybean meal. *Aquaculture* 89, 183-191.
- Ponat, A., Adelung, D., 1983. Studies to establish an optimal diet for *Carcinus maenas* 3. Vitamin and quantitative lipid requirements. *Mar. Biol.* 74, 275 – 279.
- Pongmaneerat, J., Watanabe, T., Takeuchi, T., Satoh, S., 1993. Use of different protein meals as partial or total substitution for fish meal in carp diets. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1249-1257.

- Ramos, R., Andreatta, E., 2011. Gross protein and energy requirements for pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) juvenile under different salinities. *Latin Am. J. Aquat. Res.* 39, 427 – 438.
- Ranhotra, G.S., Gelroth, J.A., Glaser, B.K., Lorenz, K.J., Johnson, D.L., 1993. Composition and Protein Nutritional Quality of Quinoa. *Cereal Chemistry*, 70 303–305.
- Regost, C. J. Arzel, Kaushik, S.J., 1999. Partial or replacement of fish meal by corn gluten meal (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180, 99-117.
- Reichert, R.D., Tatarynovichm, J.T., Tyler, R.T., 1986. Abrasive dehulling of quinoa (*Chenopodium quinoa*): effect on saponin content as determined by an adapted hemolytic assay. *Cereal Chemistry* 63, 471-475.
- Richard, L., Blanc, P.-P., Rigolet, V., Kaushik, S.J., Geurden, I., 2010. Maintenance and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilisation efficiencies in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. *Br. J. Nutr.* 103, 984 – 995.
- Richardson, C.M., Siccardi, A.J., Palle, S.R., Campbell, L.M., Puckhaber, L., Stipanovic, R.D., Wedegaertner, T.C., Rathore, K.S., Samocha, T.M., 2015. Evaluation of ultra-low gossypol cottonseed and regular glandless cottonseed meals as dietary protein and lipid sources for *Litopenaeus vannamei* reared under zero-exchange conditions. *Aquacult. Nutr.* doi:10.1111/anu.12261
- Rivas-Vega, M.E., Goytortúa-Bores, E., Ezquerro-Brauer, J.M., Salazar-García, M.G., Cruz-Suárez, L.E., Nolasco, H., Civera-Cerecedo, R., 2006. Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Food Chem.* 97, 41 – 49.
- Robaina, L., M. S., Izquierdo, Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219-233.
- Robinson, E.H., Wilson, R.P., Poe, W.E., 1981. Arginine requirement and apparent absence of a lysine–arginine antagonist in fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 111, 46-52.
- Robinson, E.H., Li, M.H., 1995. Use of cottonseed meal in aquaculture feeds. En: Lim, C y Sessa, D.J. (Ed). *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. pp. 157-165. AOCS Press. Illinois, USA.
- Rodehutschord, M., Becker, A., Pack, M., Pfeffer, E., 1997. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. *J. Nutr.* 127, 1166 – 1175.
- Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Diaz-Iglesia, E., Soto, L.A., 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. *Mar. Ecol. Process Series* 174, 67-75.
- Rout, R.K., Bandyopadhyay, S., 1999. A comparative study of shrimp feed pellets processed through cooking extruder and meat mincer. *Aquaculture Engineering* 19, 71-79.

- Ruales, J., Nair, B.M., 1993. Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 42, 1-11.
- Sá, M.V.C., Sabry-Nieto, H., Cordeiro-Junier, E., Nunes, A.J.P., 2013. Dietary concentration of marine oil affect replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.* 19, 199–210
- Samocha, T.M., Davis, D.A., Saoud, I.P., DeBault, K., 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 231, 197-203.
- Saraç, H.Z., Thaggard, H.B., Rose, J., Kelly, B.J., Gravel, M.R., 1998. Utilisation of Plant Protein Sources. In: Smith, D.M. (Ed), *Fishmeal Replacement in Aquaculture Diets for Prawns*. Final Report of Project 93/120-02 to the Fisheries Research and Development Corporation, Canberra, Australia, pp 168. In Glencroos, B.D., 2001. *Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds*. 126pp.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, third ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 181-257.
- Satoh, S.D., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Hardy, R.W., Eales, J.G., Deacon, G. 1998. Effect of extrusion processing on the nutritive value of canola meal for Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) in seawater. *Aquacult. Nutr.* 4, 115-122.
- Sedgwick, R.W., 1979. Influence of dietary protein and energy on growth, food consumption and food conversion efficiency in *Penaeus merguensis* de man. *Aquaculture* 16, 7 – 30.
- Serrano, E., Storebakken, T., Penn, M., Landsverk, T., Hansen, J. Ø., Mydland, L. T., 2008, Responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary dose of lupinine alkaloid. In Palta, J.A., Berger, J.B. (Eds). 2008. 'Lupins for Health and Wealth' Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Shen, X., Liu, Y., 1992. On the digestibility of protein, oil and starch in *Penaeus orientalis*. *Can. Transl. Fish. Aquatic Sci.* 5576, 17pp.
- Shepherd, C.J., Jackson, A.J., 2013. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology* 83, 1046-1066.
- Shewbart, K.L., Mies, W.L., 1973. Studies on the nutritional requirements of brown shrimp: the effects of linolenic acid on growth of *Penaeus aztecus*. *Proc. World Maricult. Soc.* 4, 277 – 287.
- Shiau, S., Chou, B., 1991. Effects of dietary protein and energy on growth performance of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 2271-2276
- Shiau, S.Y., Peng, C.-Y., 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary levels in grass prawn *Penaeus monodon*, reared in seawater. *Aquaculture* 101, 241 – 250.



- Shiau, S.-Y., Peng, C.-Y., 1993. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* 117, 327 – 334.
- Shieh, H.S., 1969. The biosynthesis of phospholipids in the lobsters, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 679– 684.
- Shudo, K., Nakamura, K., Ishikawa, S., Kitabayashi, K., 1971. Studies on formula feed for Kuruma prawn-IV. On the growth-promoting effects on both squid liver oil and cholesterol. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 65, 129-137 .
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., 1988. Review: amaranths-an underutilize resource. *International Journal of Food Science Technology.* 23, 125-139.
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry* 127, 1409-1426.
- Smith , L.L. , Lee , P.G. , Lawrence , A.L. , Strawn , K., 1985 . Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 46, 85 – 96.
- Smith, D. M., Tabrett, S. J., Irvin, S. J., Wakeling, J., Glencross, B. D., Harris, D., 2007b. Response of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* to feed containing the lupin alkaloid, gramine. *Aquaculture* 272, 556-563.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., Irvin, S.J., Barclay, M., 2000. Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia In *Avances en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola.* 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatan, Mexico (Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar,Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. ed.), 277-286.
- Soler, M.P., 1996. Nutrientes esenciales. pp 55-116. In Soler, M.P., Rodríguez, H., Daza, P.D (eds). *Fundamentos de Nutrición y Alimentación en Acuicultura.* Serie III. INPA. Cal Publicidad, Santa Fe de Bogotá, Colombia. 342pp.
- Sookying, D., Davis, D. A., 2011. Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture* 319, 141-149.
- Stanley, R.W., Moore, L.B. 1983 . Effect on growth and apparent digestibility of diets varying in grain source and protein level in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. World Maricult. Soc.* 14, 174-184.
- Stone, D.A.J., 2003. Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 337 – 369.
- Stone, D.A.J., Allan, G.L., Anderson, A.J., 2003. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. *Aquacult. Res.* 34, 109 – 121 .
- Storebakken, T., Refstie, S., Ruyter, B., 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: *Soy in Animal Nutrition* (ed. by Drackley, J.K.), Fed. Anim. Sci. Soc., Savoy, IL, USA, pp. 127-170.
- Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Hutabarat, J., Supriharyono, A., Evans, L., 1999b. Lupin ingredients in shrimp (*Penaeus monodon*) diets: influence of lupin species and types of meals. *Aquaculture* 171, 121-133.

- Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Evans, L.H., 1996. Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 143, 331-340.
- Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Evans, L.H., 1999a. Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquacult. Nutr.* 5, 277-285.
- Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Hutabarat, J., Supriharyono, Evans, L.H., 1999b. Lupin ingredients in shrimp (*Penaeus monodon*) diets: influence of lupin species and types of meals, *Aquaculture* 171, 121-133
- Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Evans, L.H., 1999c. Replacement of Soybean meal by Lupin meal in practical diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Journal World Aquaculture Society* 30, 46-57.
- Suprayudi, M.A., Takeuchi, T., Hamasaki, K., 2012. Cholesterol effect on survival and development of larval mud crab *Scylla serrata*. *HAYATI Journal of Biosciences* 19, 1-5.
- Swick, R.A., Akiyama, D.M., Boonyaratpalin, M., Creswell, D.C., 1995. Use of soybean meal and synthetic methionine in shrimp feed. American Soybean Association, Technical Bulletin.
- Taboada, G., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., Sánchez, A., Soto, L., Rosas, C., 1998. Oxygen consumption and ammonia-N excretion related to protein requirements for growth of white shrimp, *Penaeus setiferus* (L), juveniles. *Aquacult. Res.* 29, 1-11.
- Tackaert, W., Camara, M., Sorgeloos, P., 1991. The effect of dietary phosphatidylcholine in postlarval penaeid shrimp. II. Preliminary culture results. In: Larvi '91-Fish & Crustacean Larviculture Symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F., (Eds.), European Aquaculture Society, Special Publications N°15, Gent, Belgium, pp. 80–82.
- Tacon, A.G.J., 1993. Feed ingredients for warmwater fish. Fishmeal and other processed feedstuffs, *FAO Fish. Cire.*, No. 856, FAO, Rome, Italy, 64pp.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquacult. Nutr.* 8, 121-137.
- Tacon, A. G., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158.
- Tan, B., Mai, K., Zheng, S., Zhou, Q., Liu, L., Yu, Y., 2005. Replacement of fish meal by meat and bone meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Res.* 36, 439-444.
- Terazaki, M., Thambuppa, P., Nakayama, Y., 1980. Eradication of predatory fishes in shrimp farms in utilization of Thai tea seed. *Aquaculture* 19, 235-242.
- Teshima, S., 1997. Phospholipids and sterols. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Advances in World Aquaculture, Volume 6. Crustacean Nutrition* World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 85 – 107.

- Teshima, S., 1998. Nutrition of *Penaeus japonicus*. Rev. Fish. Sci. 6, 97-111.
- Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). Aquacult. Res. 33, 395-402.
- Teshima, S., Ceccaldi, H.J., Patrois, J., Kanazawa, A., 1975. Bioconversion of desmoterol to cholesterol at various stages of molting cycle in *Palaemon serratus* Pennat, Crustacea Decapoda. Comp. Biochem. Physiol. 50B, 485-489.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1971a. Biosynthesis of sterols in the lobster *Panulirus japonica*, the prawn *Penaeus japonicus* and the crab *Portunus trituberculatus*. Comp. Biochem. Physiol. 38B, 597-602
- Teshima S., Kanazawa, A., 1971b. Bioconversion of the dietary ergosterol to cholesterol in *Artemia salina*. Comp. Biochem. Physiol. 38B, 603-607.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1972. *In vivo* bioversion of  $\beta$ -sitosterol to cholesterol in the crab, *Portunus trituberculatus*. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 21, 91 – 95.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1973a. Bioconversion of brassicasterol to cholesterol in *Artemia salina*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 38, 1305 – 1310.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1973b. Metabolism of desmosterol in the prawn, *Penaeus japonicas*. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 22, 15 – 19.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Kakuta, Y., 1986a. Effects of dietary phospholipids on growth and body composition of the juvenile prawn. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52, 155 – 158.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Kakuta, Y., 1986b. Growth, survival and body composition of the prawn larvae receiving several dietary phospholipids. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 35, 17 – 27.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Okamoto, H., 1974. Absorption of sterols and cholesterylestes in a prawn, *Penaeus japonicus*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 40, 1015-1019.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Okamoto, H., 1976. Sterol biosynthesis from acetate and the fate of dietary cholesterol and demosterol in crabs. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 42, 1273-1280.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Sasada, H., Kawasaki, M., 1982. Requirements of the larval prawn, *Penaeus japonicus*, for cholesterol and soybean phospholipids. Mem. Fac. Fish. 31, 193-199.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Sasada, H., Kawasaki, M., 1983. Nutritional value of dietary cholesterol and other sterols to larval prawn, *Penaeus japonicas* Bate. Aquaculture 31, 159 – 167.
- Teshima, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2001. Protein requirement of the prawn *Marsupenaeus japonicus* estimated by a factorial method. Hydrobiologia 449, 293 – 300.
- Teshima, S., 1971. *In vivo* transformation of ergosterol to cholesterol in crab, *Portunus trituberculatus*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 37, 671 – 674.

- Teshima, S., 1982. Sterol metabolism. In: En: Pruder, Langdon, Conklin (Eds.), Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 205–216.
- Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S., Kanazawa, A., 1997. Necessity of dietary cholesterol for the freshwater prawn . Fish. Sci. 63, 596 – 599.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1984. Effects of protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae . Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 50, 1709 – 1715.
- Teutonico, R.A., Knorr, D., 1985. Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. Food Technology 39, 49-60.
- Thongrod, S., Boonyaratpalin, M., 1998. Cholesterol and lecithin requirement of juvenile banana shrimp, *Penaeus merguensis*. Aquaculture 161, 315 – 321.
- Tibaldi, E., Tulli, F., Lanari, D., 1994. Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrus*). Aquaculture 127, 207 – 218.
- Tidwell, J. H., Webster, C.D., Clark, J.A., D’Abramo, L.R., 1993a. Evaluation of distillers dried grains with solubles as an ingredient in diets for pond culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of the World Aquaculture Society 24, 66-70.
- Tidwell, J.H., Webster, C.D. Yancey, D.H., D’Abramo, L.R., 1993b. Partial and total replacement of fishmeal with soybean meal and distillers’ by- products in diets for pond culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 118, 119-130.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev. Fish. Sci. 11, 107-184.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture 230, 21-34.
- Tocher, D.R., 1995. Glycerophospholipid metabolism. In: Hochachka , P.W. Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Metabolic and Adaptational Biochemistry, vol. 4. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 119 – 157.
- Tosaka, O., Enei, H., Hirose, Y., 1983. The production of l -lysine by fermentation. Trends Biotechnol. 1, 70 – 74.
- Treviño, L. M., Celis, A. 1995. Uso de productos de soya en la nutrición acuicola. Asociación Americana de soya. 20pp.
- Trugo, L.C., Almeida, D.C.F., 1988. Oligosaccharide contents in the seeds of cultivated lupins. J. Sci. Food Agric. 45, 21– 24.
- Trugo, L.C., Almeida, D.C.F., 1988. Oligosaccharide contents in the seeds of cultivated lupins. Journal of the Science of Food and Agriculture 45, 21–24.
- Tudor, K.W., Rosati, R.R., O’Rourke, P., Wu, V., Sessa, D., Brown, P., 1996. Technical and economical feasibility of farm fish feed production-using fishmeal’s analogous. Aquaculture Engineering 15, 53-65.

United Nations 2015 World Population Prospects: The 2015 Revision (available from: <http://esa.un.org/unpd/wpp/index.htm>)

Uyan, O., Koshio, S., Ishikawa, M., Uyan, S., Ren, T., Yokoyama, S., Komilus, C.F., Michael, F. R., 2007 . Effects of dietary phosphorus and phospholipid level on growth, and phosphorus deficiency signs in juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 267, 44 – 54.

van Barneveld, R.J., 1999. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr. Res. Rev.* 12, 203– 230.

Van Wormhoudt, A., Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., 1996. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Adaptación a la composición del régimen alimenticio. En: Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL. Monterrey, NL, México. 673 pp.

Vázquez-Añón, M., González-Esquerro, R., Saleh, E., Hampto, T., Ritcher, S., Firman, J. Knight, C.D., 2006. Evidence for 2-hydroxy-4(methylthio) butanoic acid and dl-methionine having different dose responses in growing broilers. *Poult. Sci.* 85, 1409-1420.

Vedenov, D., Pesti, G.M., 2010. An economic analysis of a methionine source comparison response model. *Poult. Sci.* 89, 2514 – 2520.

Vega-villasante, F., Nolasco, H., Rivera, C., 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I – Properties of amylase activity in the digestive tract. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 547– 550.

Velasco, M., Lawrence, A.L., Castille, F.L., Obaldo, L.G., 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-DCerecedo, R. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Merida, Mexico, pp. 181–192.

Velurtas, S.M., Diaz, A.C., Fernandez-Gimenez, A.V., Fenucci, J.L., 2011. Influence of dietary starch and cellulose levels on the metabolic profile and apparent digestibility in penaeid shrimp. *Latin Am. J. Aquat. Res.* 39, 214 – 224.

Venero, J. A., Davis, D. A., Rouse, D.B. 2007. Variable feed allowance with constant protein input for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under semi-intensive conditions in tanks and ponds. *Aquaculture* 269, 490-503.

Venkataramiah, A., Lakshmi, G., Gunther, G., 1975. Effect of protein level and vegetable matter on growth and food conversion efficiency of brown shrimp. *Aquaculture* 6, 115–125.

Virk, P., Saxena, P. K., 2003. Potential of *Amaranthus* seeds in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Bioresource Technology* 86, 25– 27.

Watanabe, T., Pongmaneerat, J., Satoh, S., Takeuchi, T., 1993. Replacement of fish meal by alternative protein sources in Rainbow trout diets. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1573-1579.

Wu, Y.V., 1986. Fractionation and characterization of protein rich material from barley after alcohol distillation. *Cereal Chemistry* 63,142-145.

- Wu, Y.V., Rosati, R.R., Sessa, D.J., Brown, P.B., 1995. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in tilapia diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1585-1588.
- Xie, F., Zeng, W., Zhou, Q., Wang, H., Wang, T., Zheng, C., Wang, Y., 2012. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 358–359, 116 – 121.
- Xu, X., Ji, W., Castell, J.D., O'Dor, R., 1993. The nutritional value of dietary n-3 and n-6 fatty acids for the Chinese prawn (*Penaeus chinensis*). *Aquaculture* 118, 277 – 285.
- Xu, X.L., Ji, W.J., Castell, J.D., O'Dor, R.K., 1994. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. *Aquaculture* 127, 29-40.
- Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Chi, S., Dong, X., 2009. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquacult. Res.* 41, 78-86.
- Yang, Y., Xie, S., Lei, W., Zhu, X., Yang, Y. 2004. Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 105-114
- Ye, J.D., Liu, X.H., Kong, J.H., Wang, K., Sun, I.Z, Zhang, C.X., Zhai, S.W., Song, K., 2012. The evaluation of practical diets on a basis of digestible crude protein, lysine and methionine for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Nutr.* 18, 651-661.
- Ye, J.D., Wang, K., Li, F.D, Sun, I.Z, Liu, X.H., 2011. Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein level. *Aquacult. Nutr.* 17, 337-347.
- Zein-Eldin, Z.P., Corliss, J., 1976. The effect of protein levels and source on growth of *Penaeus aztecus* . In: Pillay, T.V.R., Dill, W.A. (Eds.), *Avances in aquaculture*. FAO Technical Conference on Aquaculture. Kyoto, Japan, 26 May–2 June 1976, pp. 592–596.
- Zhou , Q.-C. , Wang , Y.-L. , Wang , H.-L. , Tan , B.-P., 2012. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 364–365, 252 – 258 .
- Zhou, Q.-C., Zeng, W.-P., Wang, H.-L., Wang, T., Wang, Y.-L., Wang, H.-L., Xie, F.-J., 2013. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* .*Aquaculture* 392–395, 142 – 147.
- Zwingelstein, G., Bodennec, J., Brichon, G., Abdul-Malak, N., Chapelle, S., El Babili, M., 1998. Formation of phospholipid nitrogenous bases in euryhaline fish and crustaceans. I. Effects of salinity and temperature on synthesis of phosphatidylserine and its decarboxylation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120, 467-473.