

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2024. Todos los derechos reservados.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Desempeño biológico del camarón blanco (*Penaeus vannamei*)
alimentado con fermento de harina de soya con
*Saccharomyces boulardii***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

David Alejandro Valdez Mireles

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
David Alejandro Valdez Mireles

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Misael Rosales Leija
Director de tesis

Dr. André Luiz Braga de Souza

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **David Alejandro Valdez Mireles** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Desempeño biológico del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) alimentado con fermento de harina de soya con *Saccharomyces boulardii*

Resumen aprobado por:

Dr. Misael Rosales Leija
Director **de tesis**

Si bien la camaronicultura es una de las actividades acuícolas con mayor crecimiento industrial, el aumento de los costos de las dietas formuladas pone en riesgo su rentabilidad y sostenibilidad. Para reducir el costo de las dietas, se ha propuesto el uso de proteínas vegetales, como la harina de soya. Sin embargo, cuando se incluyen niveles elevados en las dietas para *Penaeus vannamei*, se observa una reducción del crecimiento debido, en parte, a la presencia de factores antinutricionales. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la fermentación en la harina de soya con *Sacharomyces boulardii* sobre su valor nutricional y la cantidad de inhibidores de tripsina. Se realizó un bioensayo para determinar el efecto de la harina de soya fermentada con *S. boulardii*, utilizando tres dietas experimentales sustituyendo parcialmente una ración completa de una dieta comercial, por la harina de soya fermentada al 10, 20 y 30% de sustitución (% de materia seca) y una dieta comercial sin sustitución como dieta control. Cada una de las dietas experimentales se les asignó cinco unidades experimentales (réplicas) de forma aleatoria y cuatro unidades experimentales al grupo control. Las unidades estaban conectados a un sistema de recirculación para controlar los parámetros de calidad de agua. Se seleccionaron y sembraron aleatoriamente cinco camarones (0.1 ± 0.02 g) sin indicios de estrés en cada unidad. Los camarones fueron alimentados durante 39 días. Al final del estudio, se utilizaron como indicadores del desempeño biológico el crecimiento específico, supervivencia, TCA, índice de eficiencia proteica y daños intestinales. Se realizó un análisis económico para determinar la rentabilidad de la soya fermentada. El estudio demostró que el proceso de fermentación aumentó el porcentaje de proteína cruda de la harina de soya en un 4.58% y redujo la cantidad de inhibición de tripsina en un 47%, en comparación con la harina de soya antes de la fermentación. Además, los tratamientos experimentales no afectaron negativamente a los indicadores de desempeño biológico. Se concluye que la harina de soya fermentada es un recurso económicamente atractivo para reducir los costos de las dietas sin comprometer el desempeño biológico.

Palabras clave: camarón, levadura, fermentación, harina de soya, inhibidores de tripsina

Abstract of the thesis presented by **David Alejandro Valdez Mireles** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Biological performance of white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed with fermented soybean meal with *Saccharomyces boulardii*

Abstract approved by:

Dr. Misael Rosales Leija
Thesis Director

Although shrimp farming is one of the aquaculture activities with the greatest industrial growth, the increase in the cost of formulated diets challenges its profitability and sustainability. To reduce the cost of diets, the use of vegetable proteins, such as soybean meal, has been proposed. However, when high levels are included in diets for *Penaeus vannamei*, a reduction in growth is observed due, in part, to the presence of anti-nutritional factors. The objective of the present study was to evaluate the effect of fermentation in soybean meal with *Saccharomyces boulardii* on its nutritional value and the quantity of trypsin inhibitors. A bioassay was conducted to evaluate the effect of fermented soybean meal with *S. boulardii*, using three experimental diets partially replacing a complete ration of a commercial diet with fermented soybean meal at 10, 20 and 30% substitution (% dry matter) and a commercial diet without substitution as a control diet. Each of the experimental diets was randomly assigned five experimental units (replicates) and four experimental units to the control group. The units were connected to a recirculation system to control water quality parameters. Five shrimp (0.1 ± 0.02 g) with no signs of stress were randomly selected and stocked in each unit. The shrimp were fed for 39 days. At the end of the study, specific growth, survival, FRC, protein conversion efficiency and intestinal damage were used as indicators of biological performance. An economic analysis was conducted to determine the profitability of fermented soybean meal. The study showed that the fermentation process increased the percentage of crude protein percentage of soybean meal by 4.58% and reduced the amount of trypsin inhibition by 47% compared to soybean meal before fermentation. Additionally, the experimental treatments did not negatively affect the biological performance indicator. It is concluded that fermented soybean meal is an economically attractive resource to reduce diet cost without compromising the biological performance

Keywords: shrimp, yeast, fermentation, soybean meal and trypsin inhibitor

Dedicatoria

Con todo mi corazón, principalmente le dedico mi tesis a mi madre por ser el pilar principal para finalizar mi etapa de maestría. Le agradezco por cuidarme, apoyarme y creer en mí a pesar de las adversidades, por alentarme en mis momentos difíciles y ayudarme a darme cuenta de que, a pesar de las dificultades que uno puede enfrentar, siempre lo bueno vendrá con tal que te esfuerces y creas en tus capacidades. También le dedico este trabajo a mi hermana, Hannah Mireles, y a mis abuelas, Cristina Higuera y Eva León, por ser quienes me brindaron todo el amor incondicional que necesitaba para sentirme con las energías para seguir adelante. A mis familiares cercanos, que siempre han confiado en mí y a mis queridos amigos, en especial a Erik Lara Andrade, que han perdurado en mi vida.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al departamento de Acuicultura. Gracias por recibirme como estudiante de maestría en el posgrado de Ciencias en Acuicultura y por el apoyo económico que me fue otorgado en mi último cuatrimestre de estudios.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada, brindándome el apoyo económico necesario para realizar mis estudios de maestría.

A mi director de tesis, Dr. Misael Rosales Leija, por ser parte fundamental de mi crecimiento profesional. Gracias por todo el aprendizaje, los consejos, la confianza, la amistad y por su apoyo en todo momento. Espero que esté sea una más de las muchas colaboraciones que podamos tener en el futuro.

A los miembros de comité de tesis; Dr. André Braga, Dr. Benjamín Barón Sevilla, Dr. Juan Pablo Lazo Corvera y Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier por sus observaciones, preguntas, correcciones y todos los aportes que ayudaron a enriquecer esta tesis.

A la Dra. María Teresa Viana por proporcionarme parte de los insumos utilizados para la realización del experimento.

Al LBA Francisco Mar Morineau Escalante, técnico general del Departamento de Acuicultura, por su apoyo y atención en la planificación y armado del sistema de recirculación utilizado en el experimento, por todos los días que me apoyó para el mantenimiento del sistema, alimentación, siembra y cosecha de los organismos.

Al Maestro en Ciencias Abelardo Campos Espinoza, técnico de laboratorio de nutrición acuícola del Departamento de Acuicultura, por los días que invirtió en la investigación de metodologías e implementación de buenas técnicas para diferentes procesos de laboratorio de alta precisión.

A la Maestra en Ciencias Yanet Guerrero Rentería, técnico de laboratorio de biología y patología de organismos acuáticos del Departamento de Acuicultura, por su apoyo y atención en la elaboración de laminillas histológicas y hasta la investigación de mi tema de tesis.

A mis mejores amigos Erik Lara Andrade y Grecia Dayana Sánchez Rosales por ser mi segunda familia, ya que ustedes me apoyaron en todo cuando mi familia no podía. También les agradezco las buenas anécdotas y el crecimiento personal que tuve con ustedes.

A la guardia de Departamento de Acuicultura Nancy Simón Galicia, por el apoyo que nos proporcionó en el cuidado del sistema en los días y horas en los cuales no me encontraba en las instalaciones.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. 1	
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Ingredientes alternativos.....	3
1.1.2 Soya.....	4
1.1.3 Factores antinutricionales de la soya.....	5
1.1.4 ¿Qué es la fermentación? Características y aplicaciones.....	6
1.1.5 ¿Qué son las levaduras? Características y aplicaciones.....	8
1.1.6 <i>Saccharomyces boulardii</i> : Características y aplicaciones.....	9
1.2 Justificación.....	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. ¡Error! Marcador no definido.	
2.1 Preparación del sistema experimental.....	13
2.2 Crecimiento celular del probiótico.....	14

2.3 Fabricación del biorreactor.....	15
2.4 Preparación del fermento.....	16
2.5 Análisis proximales de la harina de soya, fermento de 3 días de harina de soya y dieta comercial.....	17
2.6 Determinación de inhibidores de tripsina/preparación de las muestras.....	17
2.7 Preparación de las dietas.....	18
2.8 Lixiviación de las dietas.....	19
2.9 Bioensayo.....	19
2.10 Disección y fijación de los organismos.....	22
2.11 Calculo de costos.....	22
2.17 Análisis estadísticos.....	23
Capítulo 3.	24
3.1 Crecimiento celular del probiótico.....	24
3.2 Análisis de inhibición de tripsina.....	24
3.3 Ensayo de lixiviación de las dietas.....	26
3.4 Parámetros físicos y químicos del agua.....	26
3.5 Análisis de desempeño de los camarones alimentados con las dietas experimentales.....	27
3.6 Análisis histológico.....	28
3.7 Análisis económico.....	31
Capítulo 4.	¡Error! Marcador no definido.
4.1 Comparativa entre la harina de soya sin fermentar y la harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i>	33
4.2 Desempeño biológico de los organismos.....	34
4.2.1 Estrés por factores abióticos.....	35
4.2.2 Densidad de cultivo.....	35
4.2.3 Dietas experimentales.....	36

4.2.4 Condición sanitaria del sistema.....38

4.3 Morfología del intestino.....38

4.4 Análisis de costos.....39

Capítulo 5. 41

5.1 Consideraciones.....41

Literatura citada.....42

Anexos.....48

Lista de figuras

Figura	Página
1. Unidades experimentales del Sistema de Recirculación Acuícola utilizado para evaluar el desempeño biológico del camarón blanco (<i>P. vannamei</i>) alimentado con un suplemento de harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i>	13
2. Componentes del Sistema de Recirculación Acuícola utilizado para evaluar el desempeño biológico del camarón blanco (<i>P. vannamei</i>) alimentado con un suplemento de harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i>	14
3. Metodología para evaluar la viabilidad y crecimiento celular de <i>S. boulardii</i> de la marca Floratil® (Biocodex, Francia).....	15
4. Biorreactor utilizado para la fermentación de la harina de soya con <i>S. boulardii</i>	15
5. Metodología del bioensayo para comparar el desempeño biológico del camarón blanco (<i>P. vannamei</i>) con dietas experimentales con diferentes porcentajes de inclusión de harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i>	20
6. Crecimiento celular de la levadura <i>S. boulardii</i> de la marca Floratil® (Biocodex, Francia) para comprobar su viabilidad para utilizarlo como microorganismo para fermentar la harina de soya en sustitución parcial de dietas para camarón blanco (<i>P. vannamei</i>).....	24
7. Porcentaje de inhibición de tripsina con diferentes porcentajes de dilución del extracto de la harina de soya no fermentada.....	25
8. Comparativa entre los porcentajes de inhibición de la tripsina de la harina de soya antes y después de ser fermentada.....	25
9. Porcentaje de lixiviación de las dietas experimentales, dieta control y la dieta comercial, después de una exposición de 24 horas en agua de mar.....	26
10. Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>) alimentado con la dieta control (0% de harina fermentada) por un periodo de cuatro semanas.....	28
11. Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>) alimentado con una dieta con 10% de remplazo con harina de soya fermentada por un periodo de cuatro semanas.....	29
12. Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>) alimentado con una dieta con 20% de remplazo con harina de soya fermentada por un periodo de cuatro semanas.....	30
13. Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>) alimentado con una dieta con 10% de remplazo con harina de soya fermentada por un periodo de cuatro semanas.....	30

14. Lista de costos por tonelada de la harina de pescado, harina de soya y harina de soya fermentada con *S. boulardii*..... 31

Lista de tablas

Tabla	Página
1	Tipos de factores antinutricionales presentes en la soya..... 5
2	Tipos de fermentaciones..... 7
3	Ingredientes para la formulación del fermento de harina de soya con <i>S. boulardi</i> 16
4	Análisis proximal de la harina de soya antes y después de su fermentación y de la dieta comercial..... 17
5	Formulación las dietas experimentales y control en peso seco para la evaluación de la harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i> en reemplazo de una ración completa de la dieta comercial (10%, 20% y 30% de remplazo) para camarón blanco del Pacífico <i>Penaeus vannamei</i> 18
6	Análisis proximal del tratamiento control (0% de remplazo de la dieta comercial) y de cada tratamiento (10,20 y 30% de remplazo con harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i>)..... 19
7	Mediciones mínimas, máximas y promedio de los parámetros físico y químicos registrados durante el tiempo del bioensayo de las dietas experimentales con porcentajes de inclusión de harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i> 26
8	Análisis de desempeño biológico del camarón blanco tras ser alimentados por un lapso de 39 con dietas experimentales con porcentajes de remplazo (10, 20 y 30%) en peso seco de una ración completa de la dieta comercial por la harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i> 27
9	Lista de costos de los insumos utilizados para la preparación de 1 tonelada de harina de soya fermentada con <i>S. boulardii</i> 31
10	Lista de reactivos utilizados para el análisis de inhibición de tripsina..... 48
11	(1a) Verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos de centrifuga..... 49
12	(2a) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos..... 49
13	(3a) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos..... 49
14	Cantidad de sobrenadante y agua destilada utilizada para la comparación de inhibidores de tripsina..... 50
15	(1b) Verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos de centrifuga..... 50

16	(2b) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos.....	51
17	(3b) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos.....	51
18	Deshidratación en procesador de tejidos.....	52
19	Desparafinación de muestras.....	53
20	Tinción Hematoxilina & Eosina.....	54

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura a nivel mundial ha experimentado un crecimiento del 8.9-9.1% anual desde los años 1970; por lo tanto, la demanda de recursos necesarios para dicha actividad es cada vez mayor, siendo el alimento uno de los recursos más costosos, al cual se le adjudica alrededor del 60% del egreso total (Schryver et al., 2008; Sharawy et al., 2016). Por ello, es necesario la búsqueda de alternativas que puedan ayudar a reducir dichos costos sin afectar la calidad del producto.

En la acuicultura, la camaronicultura es una de las actividades que ha tenido un mejor desempeño en crecimiento global y nacional (Córdova et al., 2009). De acuerdo con la FAO (2023), en el 2022 se registró una producción mundial de 62.2 mil toneladas de camarones peneidos, representando el 62.2% de la producción total de los crustáceos. En México, el sector camaronícola es uno de los más importantes para nuestro país, ya que, a pesar de que se encuentra en el tercer puesto en producción, es el primero en valor económico (CONAPESCA, 2021). En el año 2021, México registró una producción total de 249,958 toneladas de camarón blanco (en peso vivo), de los cuales 72.82% (182,025 toneladas) fueron producto de la acuicultura y representaron un valor total de \$23,776,651 MXN. Además, desde los últimos 10 años se ha observado un crecimiento anual promedio de 4.56% (CONAPESCA, 2021). Sin embargo, con el fin de mantener el crecimiento de una manera sostenible, existen algunos retos que tienen que ser superados. Por ejemplo, de las problemáticas que se han observado que perjudican a las actividades acuícolas, destaca el incremento en precios de las dietas formuladas y el riesgo de patógenos en las granjas de cultivo.

El incremento de los precios de las dietas formuladas es provocado principalmente por el incremento de los precios de algunos ingredientes que se utilizan para prepararlas, como la harina de pescado. La harina de pescado es un insumo importante para la producción de alimentos por ser un producto rico en proteínas. Este insumo se obtiene mediante la molienda y el secado de pescado entero o partes de este. Usualmente, se utilizan varias especies distintas de peces pelágicos pequeños como la anchoveta, sardina y arenque, cuya producción total depende solamente de la captura, lo que ocasiona que la producción de harina esté en constante fluctuación, llegando a costar hasta \$1,500 USD por tonelada (FAO, 2022). Si a esta problemática se le suman las reducciones paulatinas de la oferta y la creciente demanda de harina por el crecimiento de la industria acuícola, el resultado es el aumento en los precios en todos los productos que contienen el insumo (CONAPESCA, 2021). En la formulación de alimentos, el nutriente que tiene mayor costo es la proteína, por lo que una manera de reducir el precio del alimento formulado es utilizar ingredientes alternativos de bajo costo y que suministren proteína de buena calidad, en sustitución de

ingredientes proteicos como la harina de pescado que, además de tener un precio más elevado, su producción no es sostenible. Entre los ingredientes alternativos que se han explorado y que cumplen con estas características, se puede mencionar a la harina de soya. La harina de soya tiene algunas propiedades que la hacen un candidato apropiado para la alimentación organismos acuáticos, por su contenido de proteína, perfil de aminoácidos, disponibilidad en el mercado y su bajo costo, el cual fue menor a los \$400 USD / ton en 2020 por tonelada, y de \$7,814.35 MXN en 2024 (Amaya et al., 2007; FAO, 2022; Indexmundi, 2024). Sin embargo, si se compara con otros ingredientes, como la harina de pescado, se observan algunas desventajas, como: la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales como la metionina, lisina, y treonina; la carencia de ácidos grasos importantes como EPA y DHA; y la presencia de factores anti nutricionales, como los inhibidores de proteasas, así como las lectinas, ácidos fítics y polisacáridos no almidonados que pueden ser tóxicos para los organismos (Amaya et al., 2007; Sharawy et al., 2016).

Una alternativa utilizada para disminuir los efectos negativos que tienen los factores anti-nutricionales de los ingredientes vegetales es la predigestión o purificación de alto nivel con el fin de mejorar la asimilación por los organismos cultivados (Soto., 2021). Con este fin, un método que se pueda utilizar en este tipo de ingredientes es la fermentación. Diferentes estudios han demostrado que la fermentación puede ayudar a pre-digerir alimentos, proporcionar una mayor disponibilidad de macronutrientes, reducir la presencia de factores anti nutricionales y proporcionar microorganismos benéficos para la salud de los organismos acuícolas (Sharawy et al., 2016).

Por otro lado, los organismos cultivados son susceptibles a enfermedades, por lo que la sanidad es un factor primordial en las actividades acuícola. Las enfermedades en camarón pueden presentarse tanto en su hábitat natural como en cautiverio. Es importante destacar, que los organismos tienen mayor probabilidad de padecer enfermedades en las granjas de producción que en sus hábitats naturales debido a las altas densidades que se utilizan en los sistemas de producción (MAG et al., 2011). Las enfermedades han afectado particularmente a la industria camaronícola, ocasionando grandes pérdidas económicas en las granjas en donde se presentan. Una de las enfermedades con mayor incidencia es el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV; por sus siglas en inglés).

El IHHNV es un ADN virus lineal monocatenario con un tamaño de 3.91 Kb, el cual cuenta con cuatro genotipos diferentes, de los cuales solamente dos pueden infectar al camarón blanco del Pacífico. Las etapas en donde se observan los efectos adversos del virus son en el estadio juvenil y sub adulto del organismo, en donde se presenta una enfermedad crónica conocida como “síndrome de la deformidad y enanismo”, la cual provoca una disfunción en el crecimiento de los organismos, causando irregularidades

de talla y deformidad cuticular. Los organismos que sobreviven al virus se convierten en portadores permanentes del patógeno, los cuales pueden contagiar a otros organismos, tanto por transmisión vertical como horizontal, debido al consumo de tejido infectado (Godínez et al., 2012). Entre los años 2015 al 2019, se reportó la presencia de IHNV en 14 estados de México, teniendo una mayor presencia en los principales estados productores. Se reportaron un total de 1,501 focos de infección con un total de 3,179.87 millones de organismos susceptibles con un valor promedio de \$6,033.22 millones MXN, 46.18 millones de organismos infectados por el virus con un valor aproximado de \$87.61 millones MXN y 2,771.18 millones de organismos muertos de forma natural o por sacrificio con un valor estimado de \$5,257.81 millones MXN (SENASICA, 2021).

En las granjas de cultivo de camarón no existen muchas alternativas para el control de patógenos. Usualmente las alternativas utilizadas son el uso de antibióticos (en los casos en donde el problema es una bacteria), la reducción de la densidad de cultivo, la eliminación de los camarones afectados, o el uso de estrategias sanitarias que puedan prevenir la presencia de enfermedades (Leyva et al., 2010). Por lo que es indispensable la investigación de nuevas alternativas o el mejoramiento de las ya conocidas que puedan beneficiar el desempeño de los cultivos.

Una estrategia ya implementada es el uso de probióticos, los cuales son bacterias que proporcionan un beneficio a los organismos cultivados y al sistema de cultivo, como por ejemplo una: mejora de la asimilación de macronutrientes; su función como biorremediador; el control de patógenos; la activación del sistema inmune; la inhibición o erradicación de microorganismos patógenos por producción de compuestos inhibidores o competición por nutrientes; el aporte de enzimas, vitaminas y micronutrientes; la reducción de la mortalidad; el aumento de la respuesta inmune y la mejora de la calidad del agua (Olmos, 2021; Tovar et al., 2008; Sorroza et al., 2009).

Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo estudiar el efecto de una dieta comercial adicionada con harina de soya fermentada con *S. boulardii* en diferentes porcentajes de reemplazo (10, 20 y 30%) sobre el crecimiento, supervivencia e indicadores de salud intestinal de *Penaeus vannamei*.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Ingredientes alternativos

El uso de ingredientes vegetales para utilizarlos como un sustituto proteico de la harina de pescado en la

formulación de dietas para camarón ha tomado relevancia mundialmente, ya que presentan un nivel proteico aceptable, un perfil de aminoácidos adecuado, una buena rentabilidad por su bajo costo y una gran disposición en el mercado global. Sin embargo, a pesar de tener un buen perfil de aminoácidos, no cumplen adecuadamente las necesidades nutricionales del camarón blanco debido a las deficiencias de algunos aminoácidos esenciales, como la metionina y cisteína, para el óptimo desempeño de los organismos, además de que contienen factores anti nutricionales que afectan el rendimiento de los organismos (Dersjant-Li et al., 2002; NRC, 2011; Sookying et al., 2013).

Para poder considerar que un ingrediente vegetal puede ser utilizado para la formulación de dietas para camarón blanco, es necesario que cumpla con ciertas características nutricionales, como un nivel bajo de fibra, almidón y anti nutrientes. Además, es necesario que los ingredientes contengan un alto nivel proteico, que contenga los aminoácidos necesarios para el óptimo crecimiento de los organismos, un alto nivel de digestibilidad y buena palatabilidad (Sookying et al., 2013).

1.1.2 Soya

Entre toda la diversidad de semillas de cereales y leguminosas, la soya, junto con sus diferentes presentaciones (harina de soya, concentrado de proteína de soya y extruido de semillas de soya), es la proteína vegetal con el mejor desempeño como ingrediente para alimento de peces por su perfil de aminoácidos balanceado y contenido de macro y micronutrientes. Además, la soya cuenta con diferentes ventajas, como que es resistente a la oxidación, al deterioro y es naturalmente libre de hongos, virus y bacterias que pueden ser dañinos para peces y camarones. A pesar de ello, se ha demostrado que su uso en grandes cantidades puede afectar el crecimiento de los organismos debido a la presencia de sustancias anti nutricionales (Dersjant-Li et al., 2002).

Soares et al. (2015) evaluaron el rendimiento de *P. vannamei* alimentado con dietas formuladas con un remplazo parcial de harina de pescado por concentrado de proteína de soya (0, 25, 50, 75 y 100%) y observaron que a pesar de que todas las dietas contaban con el mismo nivel de proteína digestible, la concentración de algunos aminoácidos esenciales para el crecimiento de *P. vannamei*, como la metionina y metionina + cistina, disminuyen conforme la inclusión del concentrado de proteína de soya aumenta. Además, se observó que los organismos alimentados con las dietas con un remplazó mayor del 25% presentaron un crecimiento menor.

Hulefeld et al. (2018) evaluaron el rendimiento de una harina de soya mejorada como remplazo de la harina de pescado para camarón blanco. En su experimento evaluaron cuatro dietas isoproteicas e isolipídicas; tres dietas experimentales (33, 66 y 100% de remplazo) y un tratamiento control (0% de remplazo), los organismos fueron alimentados durante 12 semanas. Al finalizar el experimento, se observó que la dieta control produjo el mejor rendimiento en el peso final. Adicionalmente, aunque no se encontraron diferencias significativas entre la dieta control y la dieta con 33% de remplazo, se observó que conforme el porcentaje de remplazo aumentaba el peso ganado disminuía.

1.1.3 Factores antinutricionales de la soya

Las sustancias antinutricionales son compuestos que alteran el valor nutricional del alimento, ya que tienen la capacidad de interferir con la digestibilidad de los nutrientes, bloquear la utilización de minerales, promover la pérdida de proteína endógena, exacerbar la neurotransmisión en el sistema nervioso, alterar el sistema inmunológico, causar trastornos digestivos y causar daños anatómicos y estructurales que retardan el crecimiento de los animales cuando su consumo es de forma intensiva (Lozada et al., 2017). Las sustancias antinutricionales son sustancias no fibrosas sintetizadas por rutas metabólicas secundarias de las plantas con el fin de ofrecerles un mecanismo de defensa en situaciones de estrés o depredación. Estas sustancias se pueden clasificar como termolábiles y termo-estables (Tabla 1). La soya contiene diversos factores anti nutricionales como los inhibidores de proteasas, ácidos fítics, lectinas y saponinas (Elizalde et al., 2009).

Tabla 1.- Tipos de factores anti-nutricionales presentes en la soya (Peisker, 2001).

Termolábiles	Termo-estables
Inhibidores proteasas	Saponinas
Lectinas	Estrógenos
Goitrógenos	Cianógenos
	Fitatos
	Oligosacáridos
	Antígenos

Uno de los factores anti-nutricionales más importantes que se encuentra en la soya son los inhibidores de proteasas (inhibidores de tripsina). Estos inhibidores se clasifican en dos categorías diferentes: el inhibidor

Kunitz y el inhibidor Bowman-Birk, los cuales atacan a la tripsina y a la quimotripsina en diferentes sitios de unión, respectivamente (Gilani et al., 2012).

Diferentes estudios han demostrado que los inhibidores de proteasas tienen un efecto negativo en la digestibilidad de las proteínas y lípidos, por lo que afectan el crecimiento de organismos como el salmón, trucha arcoíris, carpas, tilapias del Nilo y el bagre de canal (Dersjant-Li et al., 2002). Las saponinas, son las causantes de una mala palatabilidad, alteraciones en el funcionamiento intestinal y de daños en el epitelio branquial al estar en el agua. Por otro lado, se ha demostrado que las lectinas tienen un efecto adverso en el intestino, causando cambios en la morfología del intestino, reduciendo así la absorción de los nutrientes en el salmón del Atlántico (Dersjant-Li et al., 2002).

En un estudio con *Totoaba macdonaldi*, se observó la presencia de enteritis severa en el intestino distal de los organismos alimentados con dietas con inclusiones de harina de soya por encima del 22%. Además, se observó una mayor presencia de exfoliación epitelial del borde del cepillo intestinal en relación con los porcentajes de inclusión de la harina de soya (Fuentes et al., 2017).

Con el fin de disminuir el efecto negativo que tienen los factores antinutricionales en la producción de organismos acuáticos, se han utilizado procesos de fermentación de ingredientes vegetales para mejorar su calidad y eficiencia al momento de ser utilizados como componentes en las dietas para consumo animal. A continuación, se describirá qué es la fermentación y se resumirán los resultados de estudios que han evaluado ingredientes fermentados en dietas para organismos acuáticos.

1.1.4 ¿Qué es la fermentación? Características y aplicaciones

La fermentación es un proceso metabólico, mediado por microorganismos como las bacterias y levaduras, que se encarga de liberar energía mediante la degradación de moléculas orgánicas. Usualmente, ocurre en entornos en los cuales no hay presencia de oxígeno (fermentación anaeróbica), aunque hay casos en los cuales se puede realizar con la presencia de oxígeno (fermentación aeróbica), ya que no necesariamente se utiliza el ciclo de Krebs o la cadena transportadora de electrones.

Puede utilizar las moléculas orgánicas como aceptor final de electrones produciendo pequeñas cantidades de ATP (entre una a dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa), en consecuencia, gran parte de la energía contenida en la glucosa permanece en los enlaces químicos de los productos orgánicos finales

que genera la fermentación (Tortora et al., 2007). Existen diferentes tipos de fermentaciones y se clasifican por el sustrato base o por los productos que se forman al final del proceso, los cuales son: alcohólica, acética, homoláctica, heteroláctica, butírica, butanol y caproato/butirato (Madigan et al., 2015) (Tabla 2).

Tabla 2.- Tipos de fermentaciones (Madigan et al., 2015).

Tipo	Reacción	Organismos
Alcohólica	$Hexosa \rightarrow 2 etanol + 2CO_2$	Levadura, <i>Zymomonas</i>
Homoláctica	$Hexosa \rightarrow lactato^- + 2H^+$	<i>Streptococcus</i> , algunos <i>Lactobacillus</i>
Heteroláctica	$Hexosa \rightarrow lactato^- + etanol + CO_2 + H^+$	<i>Leuconostoc</i> , algunos <i>Lactobacillus</i>
Ácido propiónico	$2 Lactato \rightarrow 2 propionato^- + acetato^- + CO_2 + H_2O$	<i>Propionibacteriu</i> , <i>Clostridium</i> <i>propionicum</i>
Ácidos mixtos	$Hexosa \rightarrow etanol + 2,3 - butanodiol + succinato^{2-} + lactato^- + acetato^- + formiato^- + H_2 + CO_2$	Enterobacterias como <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>
Ácido butírico	$Hexosa \rightarrow Butirato^- + 2H_2 + 2CO_2 + 4H_2$	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i>
Butanol	$2 Hexosa \rightarrow butanol + acetona + 5CO_2 + 4H_2$	<i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i>
Caproato / butirato	$6 Etanol + 3 acetato^- \rightarrow 3 butirato^- + caproato + 2H_2 + 4H_2O + H^+$	<i>Clostridium</i> <i>kluveri</i>
Acetogénica	$Fructosa \rightarrow 3 acetato^- + 3H^+$	<i>Clostridium</i> <i>aceticum</i>

Algunas de las ventajas de fermentar ingredientes vegetales son las siguientes: la predigestión del alimento, una mayor disponibilidad de macronutrientes, la disminución de factores antinutricionales y la presencia de microorganismos benéficos para la salud del hospedero (Olmos Soto, 2021; Tovar et al., 2008; Sorroza et al., 2009). Por ejemplo, Sharawy et al. (2016) reemplazaron parcial y totalmente la harina de

pescado por harina de soya sometida a diferentes tiempos de fermentación en estado sólido con *Saccharomyces cerevisiae* en dietas de postlarva de *Fenneropenaeus indicus*, con lo que concluyeron que conforme aumenta el tiempo de fermentación de la soya se aumenta la concentración de proteína cruda y lípidos, y disminuyen los factores antinutricionales, como el inhibidor de tripsina y ácidos fítics.

Similarmente, Bae et al. (2020) evaluaron en *P. vannamei* el efecto de la alimentación con una dieta control formulada con harina de pescado y seis dietas formuladas con proteína vegetal; dos adicionadas con 20 y 40% de harina de soya; dos adicionadas con 20 y 40% de harina de soya fermentada con *Bacillus subtilis*; y dos adicionadas con 20 y 40% de harina de sésamo. Aunque en este estudio se observó que, en los parámetros de peso ganado, crecimiento específico, eficiencia alimenticia y eficiencia proteica, no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los demás tratamientos, los organismos alimentados con la dieta con 20% de inclusión de harina de soya fermentada tuvieron un crecimiento significativamente mayor que los organismos alimentados con las dietas con un 20 y 40% de inclusión de harina de sésamo.

Olmos et al. (2011) evaluaron el efecto de cuatro dietas en el camarón blanco: una dieta comercial (control positivo), una dieta con 100 % de soya como base proteica y con la adición de *Bacillus subtilis*, una dieta con 100 % de soya como base proteica y con la adición de *Bacillus megaterium* y una dieta con harina de soya sin la adición de probióticos. Se determinó que el tratamiento de soya con *Bacillus subtilis* fue el que mejor desempeño en crecimiento mostró, mientras que el tratamiento de soya sin probiótico fue la que mostró un menor desempeño de crecimiento.

No obstante, existen limitaciones al momento de utilizar un proceso fermentativo, principalmente las condiciones de fermentación. Para poder llevar a cabo la fermentación de la forma más eficiente posible, es necesario tener el control de la temperatura, pH, tiempo de fermentación, y el control de la aparición de otros microorganismos (Mas et al., 2020; Medina, 2019; Sablayrolles, 2009). Además, para tener un óptimo control de dichas condiciones, es necesario el uso del equipo correcto, lo cual consiste en una inversión inicial relativamente alta (Sablayrolles, 2009). Por lo tanto, a pesar de que la fermentación es un método que puede beneficiar a la producción de ingredientes de mejor calidad, se tiene que tomar en cuenta el tiempo y dinero que este puede conllevar. A continuación, se describirá qué son las levaduras y se resumirá su importancia al momento de realizar un proceso fermentativo

1.1.5 ¿Qué son las levaduras? Características y aplicaciones

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares eucariontes que tienen la capacidad de replicarse de

forma asexual por fisión y que no pasan por un estado sexual dentro o sobre un esporocarpio. Se conoce que las levaduras han beneficiado a la humanidad por milenios y actualmente cuentan con una importancia fundamental en las áreas médicas, científicas, alimentarias y agropecuario por su capacidad de poder descomponer diversos componentes orgánicos mediante el proceso de fermentación (Kurtzman et al., 2011).

Con respecto al área agropecuaria, durante años, las levaduras se han utilizado como fuente viable de proteína de alta calidad en las dietas para animales. Dichos microorganismos cuentan con un alto contenido vitamínico, enzimas y cofactores que los vuelven atractivos para los animales. Usualmente, son incorporadas a las dietas con el propósito de mejorar la salud, desempeño y características zootécnicas. Algunos de los usos que se les da son: acción probiótica o prebiótica; producción de minerales, vitaminas y enzimas; promoción del crecimiento; mejoramiento de la eficiencia alimenticia; mejoramiento en la absorción de nutrientes por la diferenciación y proliferación de las células epiteliales del intestino; eliminación y control de microorganismos intestinales que pueden generar enfermedades; la estimulación del sistema inmune innato del intestino; y la disminución de olores en las heces (Castro & Rodríguez, 2005).

El uso de las levaduras como probióticos para un sistema acuícola puede proporcionar los siguientes beneficios: Mejoramiento de la calidad de agua; modificación a la microbiota intestinal del hospedero al momento de competir con bacterias patógenas por sitios de adhesión, fuentes de energía y nutrientes; Inhibición de microorganismos patógenos *in vitro*; estimulación de la respuesta inmune sistémica, local, celular y humoral; aumento de la resistencia a infecciones por otros microorganismos como lactococosis, vibrios, furunculosis, yersiniosis, amyloodinium, y aeromonas; y producción de moléculas de importancia fisiológica para el hospedero, lo que conlleva un mejor crecimiento, maduración del sistema digestivo, supervivencia y calidad larvaria (Tovar et al., 2008). Una levadura a la que se le han atribuido efectos probióticos es *Saccharomyces boulardii*. A continuación, se describirá a detalle a esta levadura junto con sus características y aplicaciones en acuicultura.

1.1.6 *Saccharomyces boulardii*: Características y aplicaciones

Saccharomyces boulardii es una levadura, no patogénica, que fue aislada por primera vez alrededor del año 1923 por el científico francés Henri Boulard, quien la encontró en las cáscaras de las frutas de lichi y de mangostán. A comienzos del año 1980, investigadores evaluaron los beneficios de *S. boulardii* al momento de ser introducido a un organismo y se determinaron sus mecanismos de acción en contra

organismos patogénicos (Czerucka et al., 2007). Con anterioridad se pensaba que *S. boulardii* era una variante de *S. cerevisiae* por su parentesco genético, pero gracias a los estudios taxonómicos, metabólicos, genéticos y al perfil enzimático, se demostró que son dos especies diferentes (Hossain et al., 2020). Una de las diferencias más relevantes entre las dos especies de levaduras, es que *S. boulardii* tiene microsátélites que no se encuentran en *S. cerevisiae*. Además, *S. boulardii* tiene características que la definen como un probiótico, ya que tienen un crecimiento óptimo en temperaturas de 37 °C en condiciones *in vitro* e *in vivo* con una tolerancia máxima de 45 °C; tiene un rango de tolerancia al pH de 2-8 por lo cual tiene la capacidad de sobrevivir los ácidos gástricos y tolerar las sales biliares; no es afectado de forma adversa por antibióticos; no causa alteraciones negativas a la microbiota intestinal; y combate agentes patógenos mediante la producción de factores que neutralizan bacterias tóxicas, además de que modulan las señales de las células encargadas de la respuesta pro-inflamatoria en la presencia de una infección bacteriana (Czerucka et al., 2007; Hossain et al., 2020).

En el área farmacéutica, *S. boulardii* se ha utilizado para la prevención o el tratamiento de enfermedades humanas por su capacidad de interactuar con la microbiota del hospedero. Su uso como probiótico destaca por sus mecanismos de acción para combatir patógenos entéricos, como: la competencia de nutrientes; inhibición de la adhesión de patógenos; degradación de toxinas bacterianas y sus receptores en la mucosa del consumidor; la estimulación de la actividad enzimática y la respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal; modula la señalización de las células del hospedero y la expresión de genes pro inflamatorios; y estimula la mucosa intestinal mediante la secreción de factores tróficos y poliaminas, lo que contribuye a aumentar las defensas inmunitarias del hospedero.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que *S. boulardii* es capaz de prevenir infecciones intestinales causadas por *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Adicionalmente, *S. boulardii* tiene la capacidad de secretar proteasas con la propiedad de degradar las toxinas que producen la bacteria *Clostridium difficile* y las fosfatasa que inactivan endotoxinas como el lipopolisacárido producido por *E. coli*. También promueve la producción de enzimas que degradan disacáridos como la lactasa, sacarasa, maltasa y la N-aminopeptidasa, permitiendo una mayor degradación y absorción de carbohidratos y restaura los niveles normales de ácidos grasos de cadena corta los cuales son necesarios para la absorción de agua y electrolitos (Tomicic et al., 2016).

Saccharomyces boulardii también se ha utilizado en el área acuícola. En un estudio de relacionado con los efectos de levaduras en las dietas de trucha arcoíris, se observó el aumento de la actividad de tres enzimas que se encuentran en el borde del cepillo de los enterocitos: fosfatasa alcalina, y-glutamyl-transpeptidasa

y leucina-aminopeptidasa, lo cual sugiere una maduración más rápida del sistema digestivo (Waché et al., 2006). En otro estudio sobre el enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana* con *S. boulardii*, se determinó que la levadura tiene la capacidad de disminuir las mortalidades relacionadas con la bacteria *V. harveyi* (Patra & Mohamed, 2003). Con relación a cultivos de camarón blanco, Sundaram et al. (2017) evaluaron el desempeño de seis diferentes cepas probióticas, incluyendo a *S. boulardii* en postlarvas. El estudio concluyó que *S. boulardii* estuvo entre las tres mejores cepas evaluadas.

Saccharomyces boulardii tiene un metabolismo fermentativo que utiliza es la alcohólica (Farinazzo et al., 2017). La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite la degradación de azúcares para producir energía y como producto residual genera 2 moléculas de alcohol y dos moléculas de dióxido de carbono, considerado un proceso complejo debido a que la levadura también debe de utilizar la glucosa y otros nutrientes para replicarse (Vázquez & Dacosta, 2007). Además, a través de esta ruta metabólica de la glicolisis, las levaduras y otros organismos fermentadores pueden sintetizar otros compuestos secundarios necesarios para el crecimiento y la reproducción. Un ejemplo de un compuesto necesario para el crecimiento de la levadura son los lípidos. *Saccharomyces Boulardii* tiene la capacidad de sintetizar lípidos cuando hay presencia de oxígeno, los cuales son importantes para la constitución de la membrana celular, promoviendo una mejor síntesis (Farinazzo et al., 2017). La ruta metabólica que más utilizan las levaduras es la glucólisis, la cual es un proceso catabólico aeróbico o anaeróbico que consiste en la oxidación de los donadores de electrones utilizando O_2 o un sustituto del O_2 como aceptor terminal de electrones. Esta ruta metabólica alternativa ocurre cuando en el medio hay O_2 disponible, debido a que genera una mayor cantidad de ATP que la fermentación (Madigan et al., 2015).

1.2 Justificación

El sector camaronícola es uno de los más importantes a nivel nacional e internacional en la industria acuícola. Sin embargo, la elevación de precios de los insumos utilizados para la preparación de dietas comerciales, junto con la falta de técnicas y tecnologías para la prevención de patógenos, afecta económicamente la sostenibilidad de esta actividad. Por lo tanto, la presente investigación se enfocará en determinar los efectos de la fermentación de la harina de soya con *S. boulardii* en su valor nutricional y porcentaje de inhibidores de tripsina en la harina de soya y el efecto de la harina de soya fermentada en el desempeño biológico del camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) tras reemplazar parcialmente una dieta comercial

1.3 Hipótesis

El proceso de fermentación con *S. boulardii* mejorará el valor nutricional y reducirá el porcentaje de inhibidores de tripsina de la harina de soya. Además, el reemplazo parcial (20%) de alimento comercial con el fermento de soya mejorará el crecimiento y supervivencia del camarón blanco (*P. vannamei*) sin ocasionar un efecto negativo en su salud.

1.4 Objetivos

1.4.3 Objetivo general

Estudiar el efecto de la fermentación de harina de soya con *S. boulardii* en la harina de soya y evaluar el efecto de la harina de soya fermentada al adicionarse parcialmente en una dieta comercial en diferentes porcentajes de reemplazo (10, 20 y 30%).

1.4.4 Objetivos específicos

- Conocer la capacidad de disminuir el porcentaje de inhibición de la tripsina de la soya fermentada con *S. boulardii*.
- Evaluar la capacidad de incrementar la calidad nutricional de la harina de soya por el proceso de fermentación.
- Evaluar el efecto en el peso ganado, tasa de conversión alimenticia, crecimiento diario, supervivencia, eficiencia proteica y crecimiento específico del fermento de soya en dieta.
- Evaluar el efecto en la salud intestinal de los camarones alimentados con dietas con fermento de soya por medio de histología intestinal.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Preparación del sistema experimental

Se construyó un Sistema de Recirculación Acuícola (RAS; por sus siglas en inglés) utilizando cubetas de 19 l como tanques (unidad experimental; UE), cada uno con una piedra de aireación para el control del oxígeno disuelto en el agua. El RAS se dividió en tres secciones, cada sección contó con un tanque de sedimentación con capacidad de 100 l con el fin de facilitar la remoción de sólidos (Figura 1). Los sedimentadores contaban con una conexión que los unía con un tanque de compensación de aproximadamente 300 l el cual contaba con un difusor de gases para la remoción de CO₂. El tanque de compensación estaba conectada a una bomba de agua que alimentaba a un biofiltro de propela con cuencas plásticas y cama empacada de aproximadamente 400 litros, el cual estaba conectado a un tanque de compensación para calentamiento de agua de 3.7 m³ (Figura 2). Todo el sistema trabaja con un volumen total de 6.5 m³. El sistema experimental fue cubierto con plástico negro con el propósito de reducir la luz natural directa al sistema para mayor control de temperatura y reducción del crecimiento de microalgas.



Figura 1.- Unidades experimentales del Sistema de Recirculación Acuícola utilizado para evaluar el desempeño biológico del camarón blanco (*P. vannamei*) alimentado con un suplemento de harina de soja fermentada con *S. boulardii*.



Figura 2.- Componentes del Sistema de Recirculación Acuicola utilizado para evaluar el desempeño biológico del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) alimentado con un suplemento de harina de soya fermentada con *Saccharomyces boulardii*. A) Cascada de agua; B) Tanque de compensación de 300 litros; C) Tanque de compensación de 3.7 m³; D) Biofiltro de propela con cuencas de plástico.

2.2 Crecimiento celular del probiótico

Se utilizó el suplemento Floratil® (Biocodex, Francia) que contiene liofilizado de *S. boulardii* equivalente a 250 mg de células vivas por cápsula. Para confirmar que la levadura liofilizada se podía activar y que se encontraba en condiciones para el proceso de fermentación, se realizó un cultivo microbiano para medir el crecimiento celular de la levadura. Para ello, se prepararon 200 ml del medio específico para levadura YPD (yeast extract peptone dextrose) agar con agua destilada estéril. Luego, se pesó en una balanza analítica la cantidad de probiótico de una cápsula. Después, se activó el probiótico con 5 ml de agua destilada estéril y con una micropipeta estéril se homogeneizó la muestra. Posteriormente, se tomó 1 ml del probiótico activado para verterlo en un vial con 5 ml de YPD agar. A partir de la primera concentración de probiótico se realizaron 5 diluciones seriadas 1 a 6 (D1-D5). Este proceso se realizó por triplicado. Todos los viales fueron colocados en una incubadora con una temperatura de 28 °C a una velocidad de agitación de 150 rpm por un lapso de 3 días. Se tomaron muestras cada 36 horas de cada uno de los viales por triplicado y fueron analizadas por espectrometría a una densidad óptica de 600 nm. Este proceso se muestra esquemáticamente en la Figura 3.

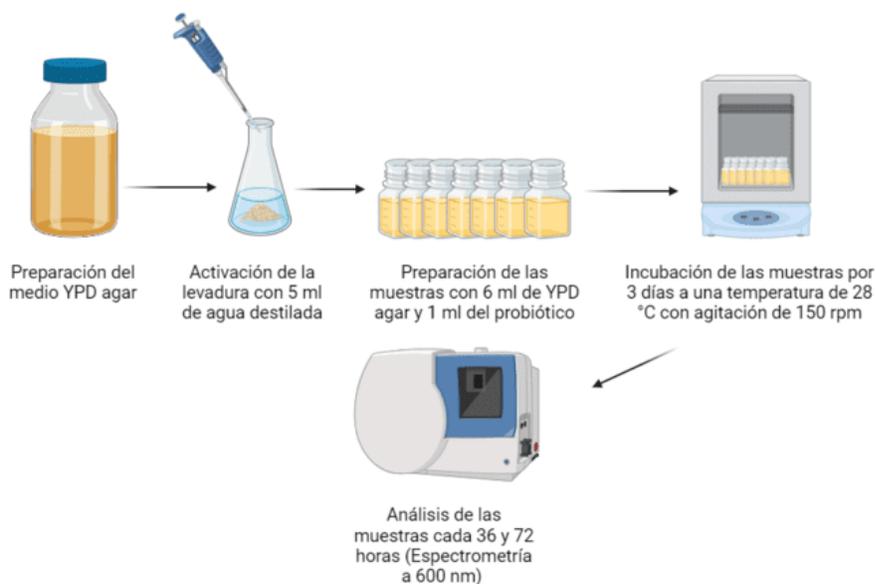


Figura 3.- Metodología para evaluar la viabilidad y crecimiento celular de *S. boulardii* de la marca Floratil® (Biocodex, Francia).

2.3 Fabricación del biorreactor

El biorreactor consistió en una cubeta de 19 l a la que se le añadió un sistema de aireación con manguera microporosa (air tube), un calentador de acuario de 200 watts y un medidor de pH y temperatura. La cubeta contó con una tapadera de sello a presión a la que se le adicionó conectores glándulas para reducir la contaminación exterior mientras se permitía la entrada del tubo de aireación y de la conexión del calentador, sensor de analizador de agua multiparamétrico y el tubo de salida de gases (Figura 4).

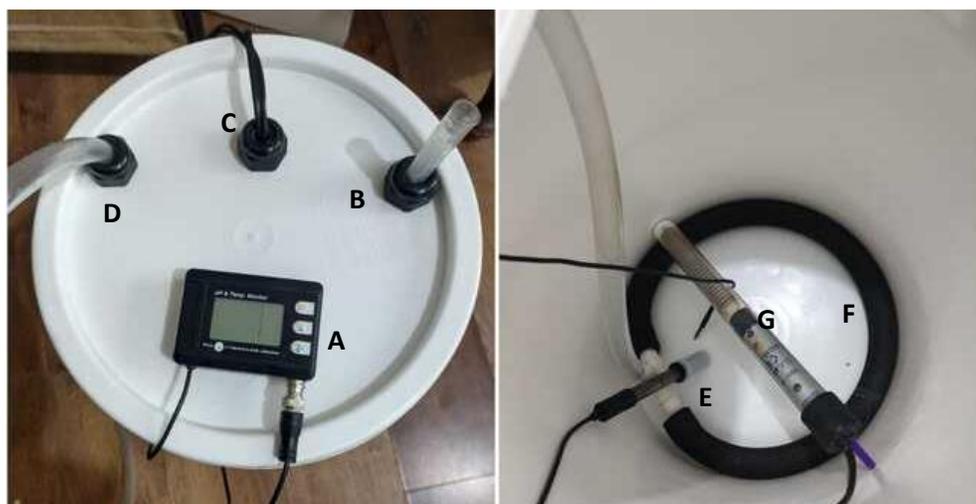


Figura 4.- Biorreactor utilizado para la fermentación de la harina de soya con *S. boulardii*. A) Lector de temperatura y pH; B) Salida de gases; C) Salida de conexiones eléctricas; D) Tubo de aireación; E) Medidor de temperatura y pH; F) Anillo de aireación; G) Calentador.

2.4 Preparación de fermento

Utilizando una resistencia de 2000 Watts, se calentó hasta llegar a punto de ebullición un volumen de 7.5 l de agua de mar previamente filtrada a 5 y 1 μm y esterilizada por luz ultravioleta. Posteriormente, el agua se dejó enfriar hasta llegar a una temperatura de 37 °C. Se tomaron 500 ml de agua recién enfriada y se agregaron 64.2 g de melaza y se homogeneizaron hasta que la melaza se diluyó por completo. Se vertieron los 7 l de agua de mar y los 500 ml de agua de mar con melaza en el biorreactor junto con 1.6 kg de harina de soya, 3.2 g de grenetina, 3.2 g de vitamina C, 1.6 g de metionina, 0.8 g de vitamina B6 y 164 ml de probiótico *S. boulardii* con una concentración de 3.5×10^7 org/ml (Tabla 3).

Todos los ingredientes se homogenizaron dentro del biorreactor por 1 minuto de forma manual con una pala para mezclar. Una vez que la mezcla se homogeneizó, se selló el biorreactor y se adicionó aire al fermento por un lapso de 30 minutos. A continuación, se clausuró toda entrada de aire por un lapso de 3 días para permitir que el proceso de fermentación se diera de forma natural. Al finalizar el tiempo de fermentación, la mezcla se guardó en bolsas Ziploc para congelarlo a -20 °C hasta que se fuera a utilizar. Para descongelar el fermento, se colocó dentro de un refrigerador a temperatura de 8 °C por un lapso de 24 horas con el propósito de tener una descongelación lenta para evitar el mayor daño posible a la levadura. Al fermento descongelado se le redujo el contenido de agua con un deshidratador con controlador de temperatura (Nesco, American Harvest), para reducir la mayor cantidad de agua posible, a una temperatura de 35 °C por un lapso de 24 horas. Tras pasar las 24 horas, el fermento fue almacenado en un recipiente con rosca y etiquetado.

Tabla 3.- Ingredientes para la formulación del fermento de harina de soya con *S. boulardii*.

Ingredientes	Cantidad
Agua de mar filtrada	7.5 l
Harina de soya	1.6 kg
Melaza	64.2 g
Grenetina	3.2 g
Metionina	1.6 g
Vitamina C	3.2 g
Vitamina B6	0.8 g
Probiótico Floratil®	164 ml

2.5 Análisis proximales de la harina de soya, fermento de 3 días de harina de soya y dieta comercial

Para comparar el valor nutricional de la harina de soya, el fermento de soya de 3 días y la dieta comercial, se realizó un análisis proximal, por triplicado, para cada una de las muestras. Los métodos utilizados fueron los establecidos por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006). Los análisis que se realizaron fueron el contenido de proteínas totales (Kjeldahl), lípidos (extracción Soxhelt), humedad (deshidratación a 135 °C por 2 horas), cenizas (incineración a 550 °C por 4 horas). Los resultados del análisis proximal de la harina de soya, la harina de soya fermentada y la dieta comercial se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- Análisis proximal de la harina de soya antes y después de su fermentación y de la dieta comercial.

Composición	Harina de soya	Fermento de 3 días	Dieta comercial
Proteína (%)	45.87	50.94	50.93
Lípidos (%)	6.31	6.55	6.88
Cenizas (%)	6.22	8.73	10.70
Humedad (%)	7.05	45.57	7.23

2.6 Determinación de inhibidores de tripsina/preparación de las muestras

Se utilizó el método ISO 14902:2001 (ISO, 2001) para poder cuantificar el porcentaje de inhibición de la tripsina en la harina de soya antes y después de la fermentación. Cabe de resaltar que, en vez de utilizar un espectrofotómetro convencional, se utilizó un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific) con el propósito de poder leer las muestras de forma más eficiente.

Las muestras fueron molidas con un molidor eléctrico de la marca Kitchen Aid y se pesó 1 g de las muestras. Cada muestra se colocó en un matraz cónico de 100 ml y se le agregaron 50 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 0.01 mol/l. Se ajustó el pH a 9.5 ± 0.1 con ácido clorhídrico (HCl) al 1 mol/l y 0.1 mol/l. Se sellaron los matraces cónicos y dejaron reposar por toda la noche (entre 15 a 24 horas) junto con 200 ml de agua destilada en un refrigerador con una temperatura controlada de 4 °C. A continuación, el sobrenadante de cada una de las muestras fue transferido a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con el agua destilada previamente enfriada a 4 °C y se dejó sedimentar en el refrigerador por un lapso de

15 minutos. Para evaluar la calidad de la tripsina, se preparó una curva de calibración para la solución de trabajo de tripsina de tripsina (Anexo A).

El proceso para la cuantificación de la inhibición de la tripsina se muestra en el Anexo B.

Para obtener el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{Estándar} - \text{Blanco estándar}) - (\text{Muestra} - \text{Blanco muestra})}{(\text{Estándar} - \text{Blanco estándar})} * 100$$

Después de realizar el análisis de las diferentes diluciones del fermento, se utilizó el porcentaje de dilución preferente con el sobrenadante de la harina fermentada utilizando la misma metodología descrita en el Anexo B.

2.7 Preparación de las dietas

Se prepararon un total de 4 dietas: Dieta control (dieta comercial), dieta con el 10% remplazo, dieta con 20% de reemplazo y dieta con 30% de reemplazo. Las cantidades de los ingredientes en peso seco que se utilizaron para cada uno de los ingredientes se encuentra en la Tabla 5.

Tabla 5.- Formulación de las dietas experimentales y control en peso seco, para la evaluación de la harina de soya fermentada con *S. boulardii* en reemplazo de una ración completa de la dieta comercial (10%, 20% y 30% de reemplazo) para camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*).

Ingredientes en peso seco	Control	10%	20%	30%
Dieta comercial (%)	95.2	83.8	71.2	58.9
Fermento (%)	0	9.5	20	30.3
Fécula de maíz (%)	0	2.9	4	6
Grenetina (%)	4.8	4.8	4.8	4.8
Total (%)	100	100	100	100

Para preparar las dietas, primero se molió la dieta comercial y el fermento con un molidor eléctrico (Kitchen Aid). A continuación, se agregó el almidón de maíz (Maizena) y se homogeneizaron por 1 minuto con una batidora de pie (Kitchen Aid). En un recipiente se calentaron 100 ml de agua hasta llegar a los 70

°C. Se agregaron 27.23 g de grenetina (Knox) y se homogeneizó hasta disolver por completo. Se vertió el agua con grenetina a las harinas homogeneizadas y se mezcló en la batidora hasta observar una masa homogénea. Al tener la masa lista, se utilizó una licuadora (Oster) para triturar la masa con el fin de obtener partículas de las dietas. A continuación, la masa triturada se tamizó con tamices de cocina de ocho y doce orificios/pulgada con el fin de seleccionar un tamaño de partícula de alimento idóneo para el consumo de los organismos. El tamaño de la partícula seleccionada fue puesto a secar en un deshidratador (Nesco, American Harvest) a una temperatura de 35 °C por un lapso de 24 horas. Tras pasar las 24 horas, la dieta se almacenó en un recipiente con rosca debidamente etiquetada. Este proceso se repitió para cada uno de los tratamientos. Posteriormente se realizaron análisis proximales a cada una de las dietas (Tabla 6).

Tabla 6.- Análisis proximal del tratamiento control (0% de remplazo de la dieta comercial) y de cada tratamiento (10, 20 y 30% de remplazo con harina de soya fermentada con *S. boulardii*).

Composición	Control	10%	20%	30%
Proteína (%)	50.93	53.06	50.05	51.97
Lípidos (%)	6.88	6.88	5.62	6.65
Humedad (%)	7.23	8.73	8.51	9.08
Cenizas (%)	10.70	10.76	10.84	10.93

2.8 Lixiviación de las dietas

Se pesaron 1 g de alimento de cada uno de los tratamientos con un total de 6 réplicas (dieta control, 10, 20 y 30%) junto con la dieta comercial. Tres muestras de cada dieta se secaron en una mufla a una temperatura de 135 °C por 4 horas y se dejaron enfriar de un día entero. Las otras tres muestras se colocaron en mallas de alimentación y se sumergieron en agua de mar un lapso de 24 horas. Las muestras se retiraron del agua y se colocaron en una mufla para secarlas siguiendo el protocolo anteriormente mencionado.

2.9 Bioensayo

Organismos con 11 días siendo postlarvas (Pl 11) fueron obtenidos del laboratorio Fitmar (Mazatlán, Sinaloa) y fueron resguardados en un tanque de maternidad en el Centro de Investigación Científica y de

Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). Al momento que los organismos obtuvieron un peso inicial aproximado de 0.1 g, se seleccionaron un total de 19 cubetas como unidades experimentales (UE) y en cada una se colocaron cinco camarones sin signos visuales de estrés. Para conocer el peso inicial de los camarones, se pesaron de forma grupal, para lo cual se secaron cuidadosamente con papel secante antes de pesarlos en una balanza (Velab). Posteriormente, se asignó un tratamiento a cada una de las UE de forma aleatoria. Cada tratamiento (10, 20 y 30%) contó con cinco réplicas y cuatro réplicas para el tratamiento control. El diseño experimental se encuentra a manera de diagrama en la Figura 5. Los organismos se aclimataron a las condiciones de espacio por un lapso de una semana.

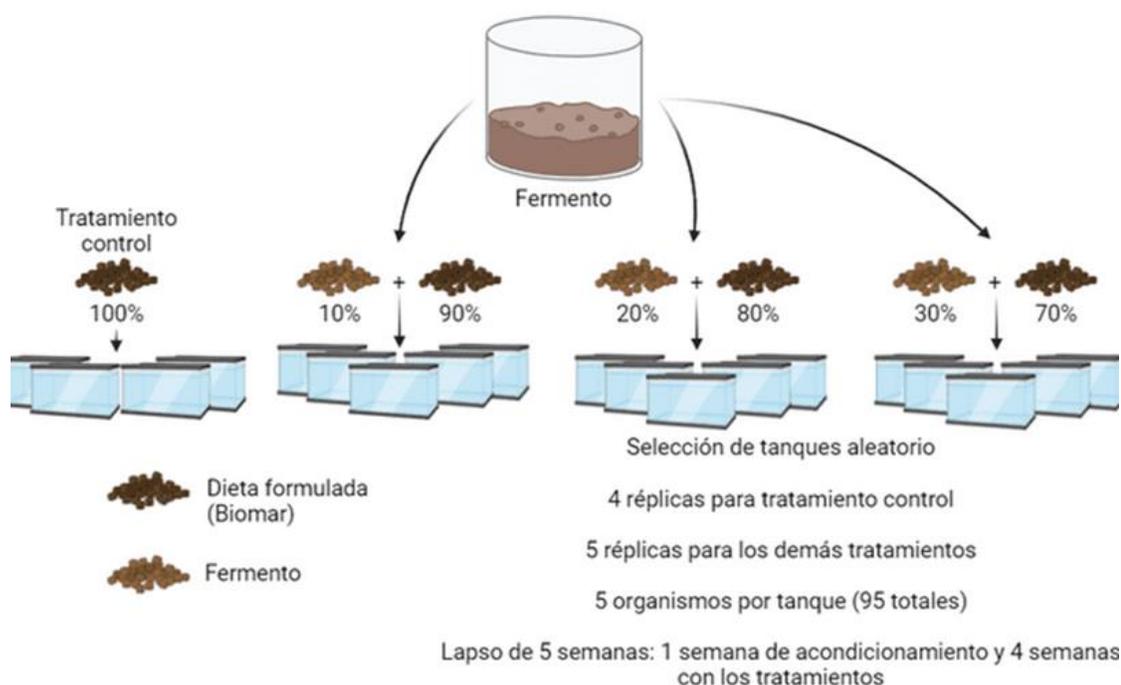


Figura 5.- Metodología del bioensayo para comparar el desempeño biológico del camarón blanco (*P. vannamei*) con dietas experimentales con diferentes porcentajes de inclusión de harina de soja fermentada con *S. bouladii*.

Los organismos pasaron por una semana de aclimatación, con el motivo de que se acostumbraran a las nuevas dimensiones de su zona de cultivo. Los organismos se alimentaron con la dieta control y las mortalidades fueron reemplazadas por organismos obtenidos del tanque de maternidad descrito anteriormente, procurando que tuvieran la misma talla que los organismos ya sembrados. Tras finalizar la semana de aclimatación, se inició el suministro de las dietas experimentales 4 veces al día (08:00, 12:00, 16:00, 20:00) a saciedad aparente por un lapso de 4 semanas. De forma semanal se realizaron biometrías de una UE por tratamiento y las mortalidades de cada UE se registraron diariamente. Durante el periodo

experimental, diariamente se midieron la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto con un multiparámetro y el amonio, nitritos y nitratos con kits colorimétricos para el control de calidad de agua del experimento. De igual manera, de forma diaria, se monitoreó el sistema de recirculación, sistema de drenaje, las piedras de aireación, las válvulas y mangueras de agua con la finalidad de mantener el sistema en completo funcionamiento.

Al finalizar el bioensayo, se contaron y pesaron de forma grupal los organismos de cada una de las cubetas. Con estos resultados se calcularon el peso promedio final, peso ganado, tasa de conversión alimenticia, índice de eficiencia proteica, crecimiento diario, crecimiento específico y supervivencia con las siguientes ecuaciones.

Peso ganado: Es el incremento del peso del organismo desde su peso inicial (Shan Cheng et al., 1990).

$$\text{Peso ganado (g)} = \text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)} \quad (1)$$

Tasa de conversión alimenticia (TCA): Es la relación que indica la cantidad de alimento necesario para que el organismo gane una unidad de peso (El-Sayed, 1999).

$$TCA = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Biomasa ganada (g)}} \quad (2)$$

Supervivencia: Es el porcentaje de organismos sobrevivientes al final del experimento tomando en cuenta la cantidad de organismos que se sembraron al inicio del experimento (Shan Cheng et al., 1990).

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\# \text{ inicial de organismos}}{\# \text{ final de organismos}} * 100 \quad (3)$$

Índice de eficiencia proteica: Es la relación que indica la ganancia de peso obtenida por la ingesta de proteína (El-Sayed, 1999).

$$\text{Eficiencia proteica} = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} \quad (4)$$

Crecimiento diario: Es la ganancia de peso obtenida diariamente por el organismo.

$$\text{Crecimiento diario (g)} = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Número de días}} \quad (5)$$

Crecimiento específico: Es la tasa de cambio de crecimiento de los organismos con respecto el tiempo teniendo en cuenta el LN del peso inicial (Powell et al., 2020).

$$\text{Crecimiento específico} = \frac{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})}{\text{tiempo}} * 100 \quad (6)$$

2.10 Disección y fijación de los organismos

Al finalizar el estudio, los camarones se inyectaron con fijador Davidson's (Anexo C). En seguida se colocaron en dicha solución por un lapso de 24-48 horas. Posteriormente se hizo un corte longitudinal para poder observar el intestino y se eliminaron la cabeza, telson, urópodos, pleópodos y pereiópodos. Las muestras se colocaron dentro de "cassettes" histológicos. A continuación, se deshidrataron en una serie de soluciones alcohólicas de distintas concentraciones, de 70% hasta 100% de alcohol (Anexo D), por un periodo de 19 horas en un procesador automático de tejidos "Histoquinete" (Leica, Estados Unidos de América, modelo TP1020). Posteriormente se hizo el aclarado, con benceno. Las muestras deshidratadas y transparentadas se incluyeron en parafina utilizando un equipo automático de inclusión de tejidos (Leica, Estados Unidos de América, modelo EG1160). Posteriormente se hicieron secciones histológicas de 5 µm de espesor con un microtomo rotatorio (Leica, Estados Unidos de América, modelo RM2255), los cortes fueron seriados para observar mejor el intestino. Las secciones de tejido se extendieron y se colocaron en un portaobjetos con su respectivo etiquetado. Los portaobjetos con las secciones de tejido se secaron y desparafinaron en una estufa (Precision Scientific Co, India) durante 24 horas a 65 °C. A continuación, pasaron por dos baños en xileno por 10 minutos, después a diferentes concentraciones de alcohol (Anexo E), entonces se lavaron con agua destilada y quedaron listas para la tinción. Las muestras se tiñeron inicialmente con el protocolo de hematoxilina y Eosina (Anexo D). Finalmente se utilizó resina sintética para preservar los tejidos y se colocó un cubreobjetos encima del tejido, para posteriormente observar las laminillas en un microscopio óptico Axiolab (Zeiss, Alemania) con el propósito de observar si los organismos padecían síntomas relacionados a enteritis.

2.17 Cálculo de costos

El cálculo de costos se realizó utilizando la página oficial del Sistema Nacional de Información de Mercado (SNIIM) para comparar los precios actuales en el mercado de la harina de pescado y la harina de soya con

el propósito de comparar sus precios con la harina de soya fermentada. Para ello, se realizó una investigación de los precios actuales de cada uno de los ingredientes utilizados en la preparación de la harina de soya fermentada.

2.18 Análisis estadísticos

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados para cada una de las variables. Las variables que cumplieron con los supuestos ($P > 0.05$) fueron analizados con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para identificar diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), de no cumplir con los supuestos se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico SPSS (IBM Statistics).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Crecimiento celular del probiótico

En la Figura 6 se presentan los resultados de crecimiento de la levadura, observándose el comportamiento de crecimiento del probiótico a las 36:00 y 72:00 horas, para las muestras de reconstitución (Re) y para las diluciones (D1-D5). Se observa un crecimiento significativamente mayor en todas las muestras a las 72:00 horas comparados con las de 36:00 horas. Además, se observó que con todas las diluciones el crecimiento fue similar, a pesar de que la concentración del probiótico disminuyó en las diluciones, lo cual indica que el probiótico cuenta con un buen índice de crecimiento.

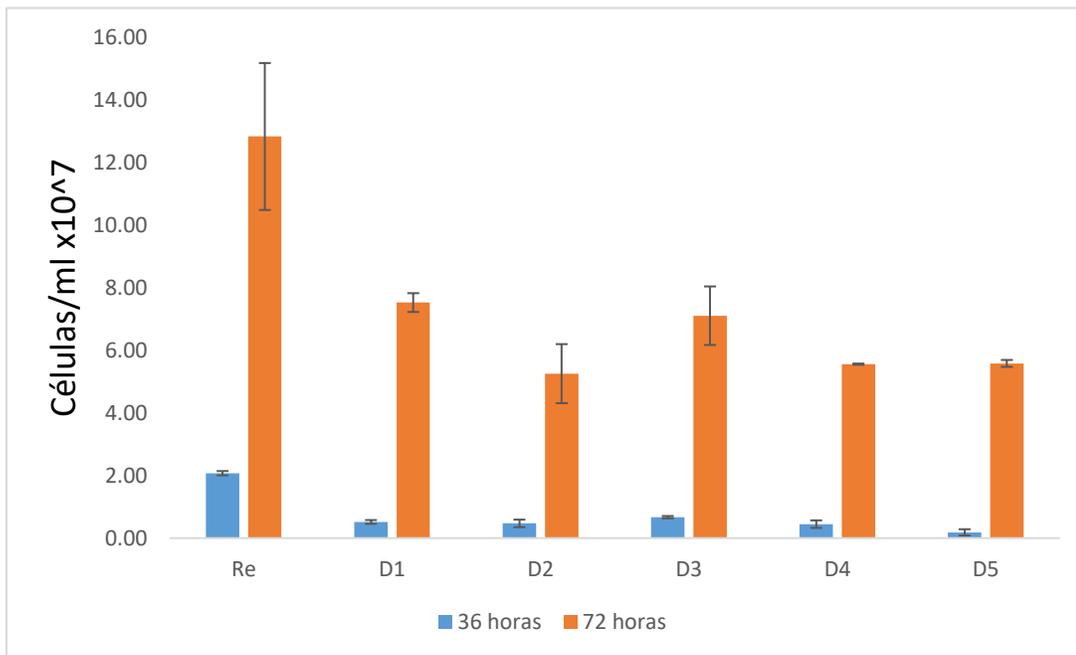


Figura 6.- Crecimiento celular de la levadura *S. boulardii* de la marca Floratil® (Biocodex, Francia) para comprobar su viabilidad para utilizarlo como microorganismo para fermentar la harina de soya en sustitución parcial de dietas para camarón blanco (*P. vannamei*). Las barras verticales indican la desviación estándar.

3.2 Análisis de inhibición de la tripsina

En la Figura 7 se presentan los resultados del porcentaje de inhibición de la tripsina para cada una de las muestras de harina de soya. Se observó que conforme se aumentaba la concentración del sobrenadante de la harina de soya, el porcentaje de inhibición de tripsina aumentaba, llegando hasta un porcentaje de

inhibición del 22% con el 100% de concentración del sobrenadante. En la Figura 8 se muestra la comparativa de inhibición de tripsina de la harina de soya antes y después del proceso de fermentación con *S. boulardii*, observándose que el fermento presenta un menor porcentaje de inhibición en comparación de la harina de soya sin fermentar, con una diferencia del 12% (i.e., 10% vs 22%, respectivamente).

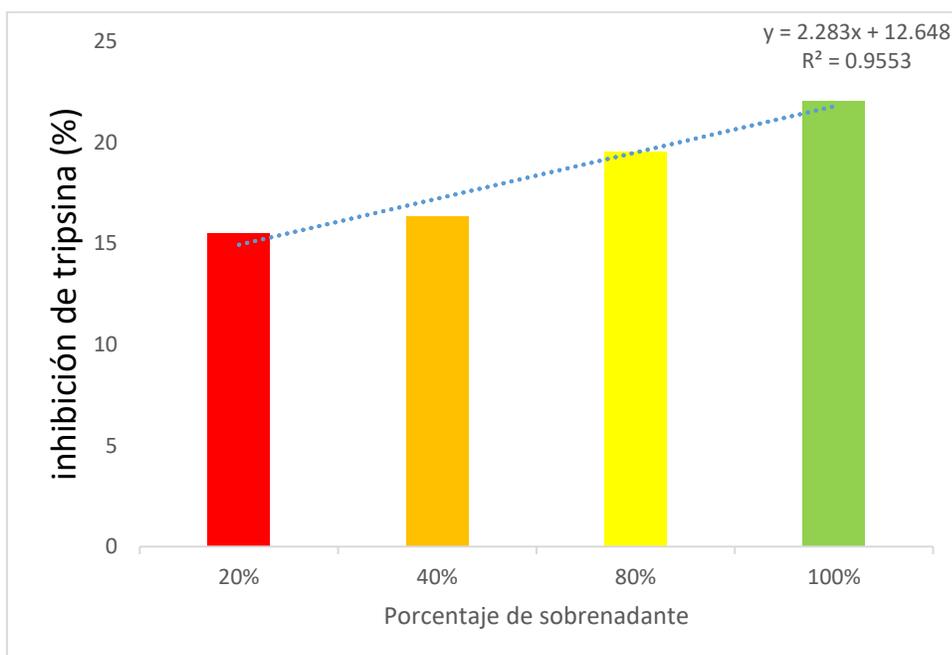


Figura 7.- Porcentaje de inhibición de tripsina con diferentes porcentajes de dilución del extracto de la harina de soya no fermentada.

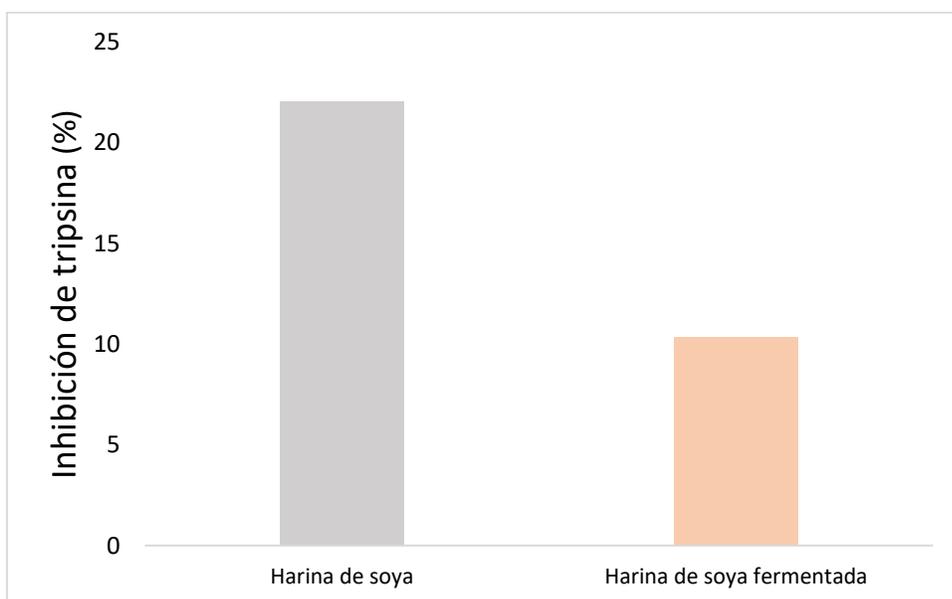


Figura 8.- Comparativa entre los porcentajes de inhibición de la tripsina de la harina de soya antes y después de ser fermentada.

3.3 Ensayo de lixiviación de las dietas

A cada una de las dietas se le realizó una prueba de lixiviación (Figura 9). Se observó que la dieta comercial no molida tuvo un porcentaje de lixiviación significativamente menor en comparación de las dietas experimentales y la dieta control. Se observó que la dieta del 10% de remplazo fue la que presentó un menor porcentaje de lixiviación entre todas las dietas experimentales, seguido de la dieta control, 30% y 20%.

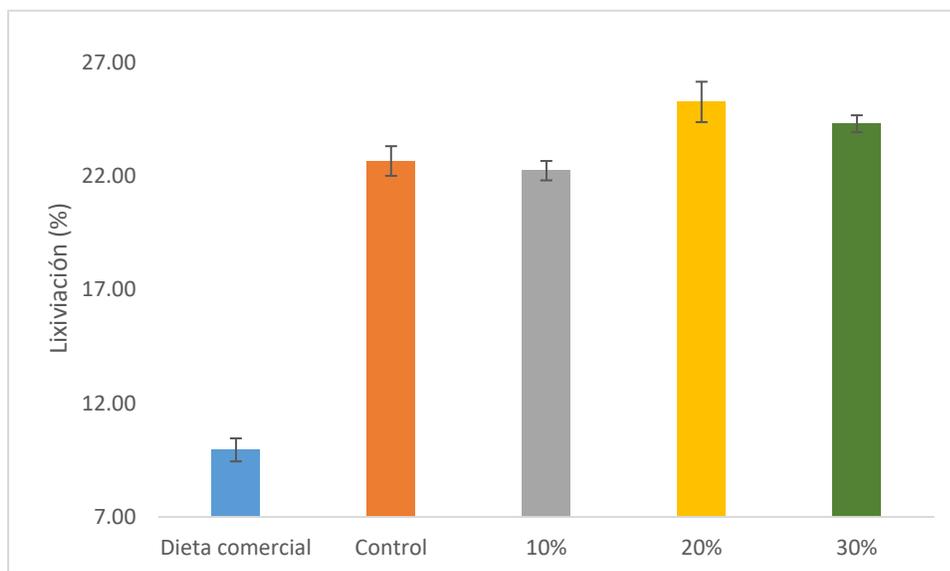


Figura 9.- Porcentaje de lixiviación de las dietas experimentales, dieta control y la dieta comercial, después de una exposición de 24 horas en agua de mar.

3.4 Parámetros físico y químicos del agua

Tabla 7.- Mediciones mínimas, máximas y promedio de los parámetros físico y químicos registrados durante el tiempo del bioensayo de las dietas experimentales con porcentajes de inclusión de harina de soya fermentada con *S. boulardii*.

Parámetros	Mínimo	máximo	Promedio
Temperatura (°C)	26.1	28.2	27.15
Salinidad	34.9	37.9	36.2
Oxígeno disuelto (mg/l)	4	5.9	5
pH	6.2	7.9	7.4
Amonio	0.5	0.5	0.5
Nitritos	0	0	0
Nitratos	0	0	0

Con respecto a los parámetros del sistema durante el bioensayo; temperatura, salinidad, nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos, nitratos, oxígeno disuelto, y pH, estos se mantuvieron en los rangos óptimos de cultivo para *P. vannamei* (Tabla 7).

3.5 Análisis de desempeño de los camarones alimentados con las dietas experimentales.

Al finalizar el estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en ninguna de las variables analizadas para determinar el desempeño de los camarones ($P > 0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8.- Análisis de desempeño biológico del camarón blanco tras ser alimentados por un lapso de 39 con dietas experimentales con porcentajes de reemplazo (10, 20 y 30%) en peso seco de una ración completa de la dieta comercial por la harina de soya fermentada con *S. boulardii*.

Tratamiento	Control	10%	20%	30%	P - value
Peso inicial individual (g)	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.052
Peso final individual (g)	0.86 ± 0.17	0.87 ± 0.11	0.86 ± 0.11	0.78 ± 0.10	0.61
Peso ganado (g)	0.77 ± 0.18	0.77 ± 0.10	0.73 ± 0.12	0.69 ± 0.09	0.67
TCA	3.74 ± 0.96	3.59 ± 0.39	3.90 ± 0.51	4.01 ± 0.48	0.71
IEP	0.55 ± 0.13	0.53 ± 0.06	0.52 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.68
Crecimiento diario (g)	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.67
Crecimiento específico	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.29
Supervivencia (%)	90 ± 11.55	80 ± 14.14	84 ± 16.73	84 ± 16.73	0.78

A continuación, se describirán las diferencias numéricas que se encontraron en estas variables. El tratamiento con el 10% de inclusión del fermento y el tratamiento control tuvieron el mejor desempeño, seguidos de los tratamientos del 20% y 30%, Con relación al peso final, se observó que los camarones

crecieron más con el tratamiento de 10%, seguido del control, 20% y 30%. Este comportamiento también se observó en el peso ganado y la tasa de conversión alimenticia (TCA), aunque en este último parámetro se esperaba una tasa de conversión más baja, ya que estos niveles son superiores al doble de lo que normalmente se observa en cultivos comerciales. Con respecto al índice de eficiencia proteica (IEP), en el tratamiento control se observó un mejor desempeño, seguido del tratamiento del 10%, 20% y 30%. En crecimiento diario con el tratamiento control y el de 10% fueron similares, seguidos de los tratamientos del 20% y 30%. Para el crecimiento específico se observó mayor similitud entre los tratamientos, con el control, 10 y 30% similares seguido del 20%. Los camarones del tratamiento del 10% tuvieron la menor supervivencia, seguido de los tratamientos del 20% y 30% y control.

3.6 Análisis histológico

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas del análisis histológico de cada uno de los ejemplares utilizados con un aumento óptico de 100x.

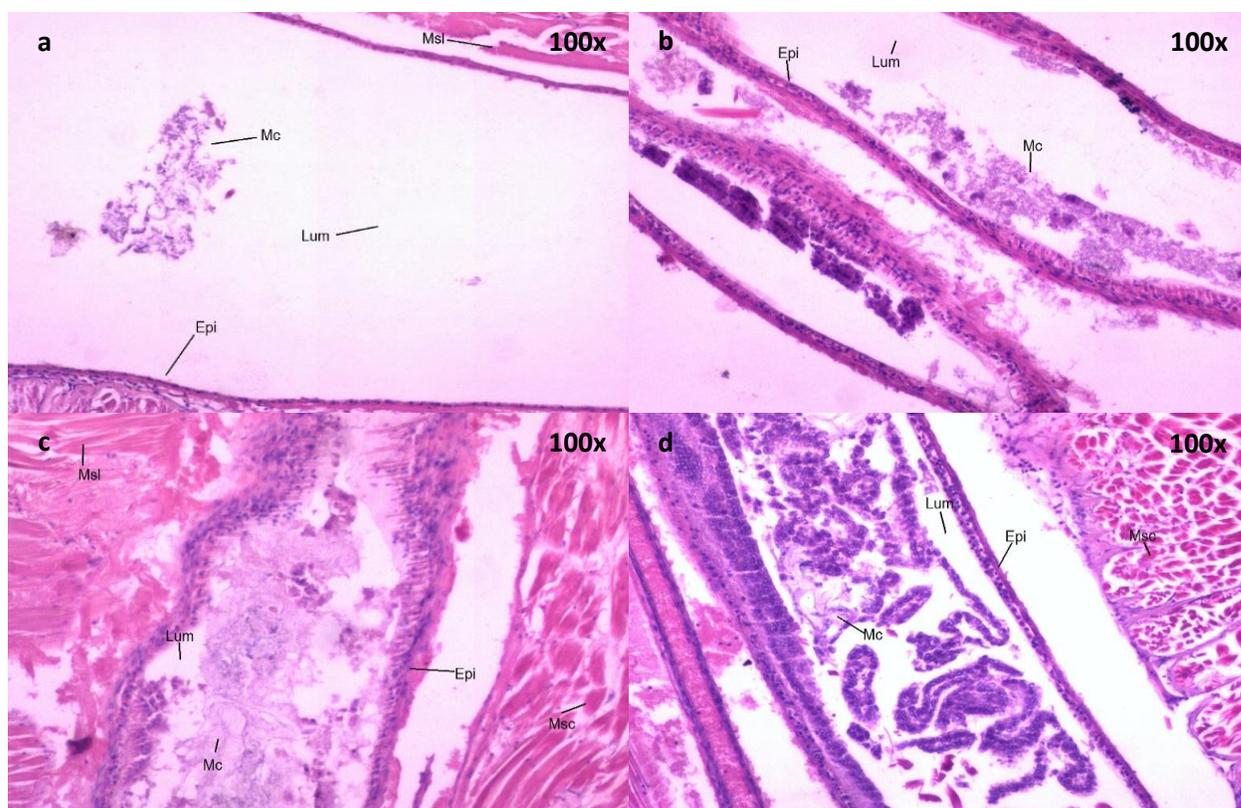


Figura 10.- Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) alimentado con la dieta control (0% de harina fermentada) por un periodo de cuatro semanas. Lumen intestinal (Lum), epitelio intestinal (Epi), material celofán (Mc), musculatura circular (Msc) y musculatura longitudinal (Msl).

En las imágenes tomadas, las estructuras que se pueden apreciar en los cortes histológicos corresponden al lumen intestinal (Lum), en el que se observó residuos de materia orgánica en forma de materia celofán (Mc), lo que nos indica que el camarón contaba con alimento en su intestino al momento de la cosecha.

Adicionalmente se puede apreciar el epitelio columnar del intestino (Epi), la musculatura circular (Msc) y longitudinal (Msl) (Figuras 10-13). En relación con el estado de los tejidos, en todos los tratamientos utilizados, incluyendo al tratamiento control, se observaron alteraciones en los tejidos. Ejemplares del tratamiento control y del tratamiento del 20% de remplazo de harina de pescado por harina de soya fermentada presentaron degradación del tejido, descamación de tejido sin identificar debido al nivel de degradación que presentaban (Figura 10/d y figura 12/b) y ejemplares del tratamiento control, tratamiento del 10 y 30% de remplazo de harina de pescado por harina de soya fermentada presentaron infiltración de hemocitos (Figuras 10/b, figura 11/a-d y figura 13/d).

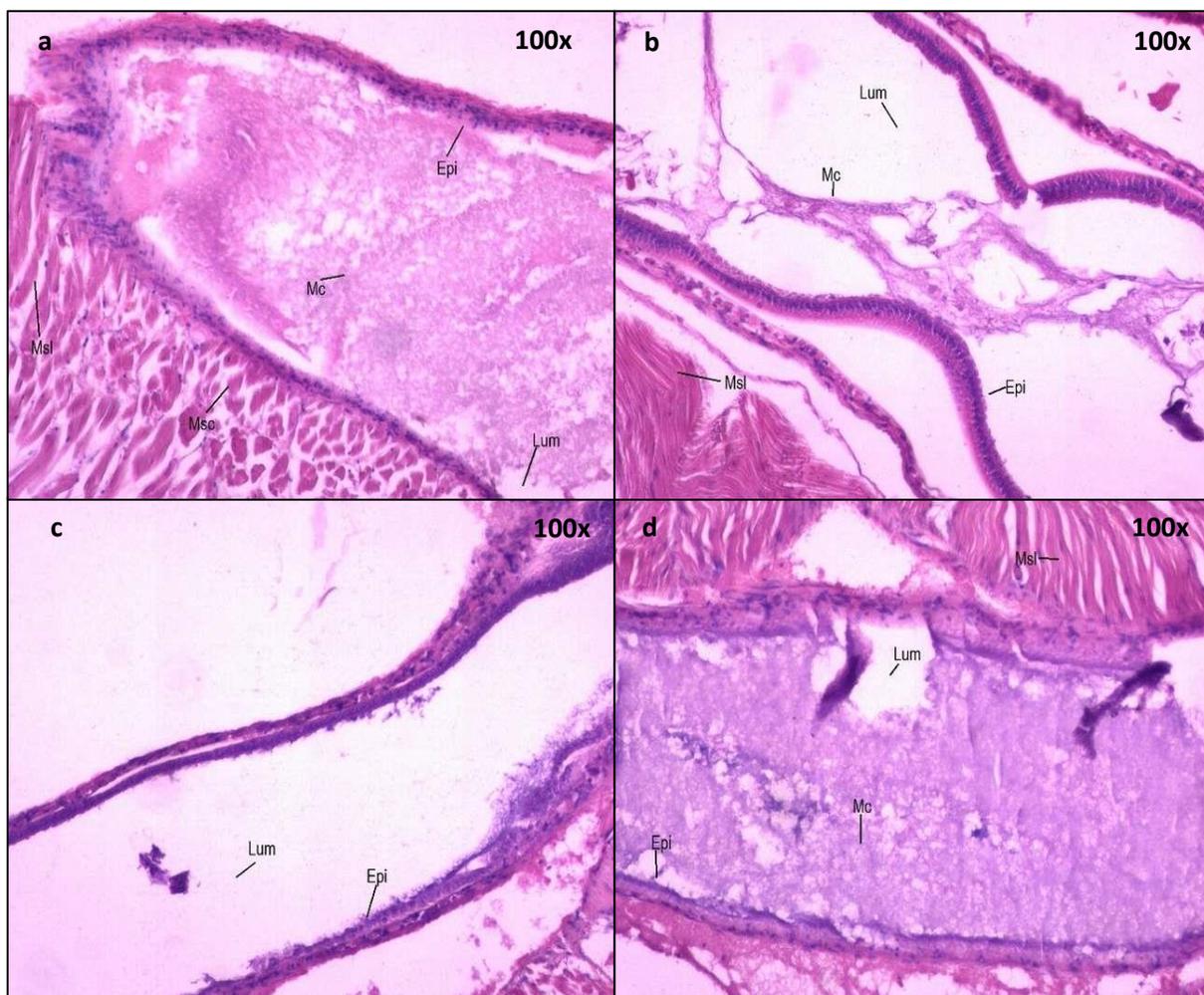


Figura 11.- Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) alimentado con una dieta con 10% de remplazo con harina de soya fermentada por un periodo de cuatro semanas. Lumen intestinal (Lum), epitelio intestinal (Epi), material celofán (Mc), musculatura circular (Msc) y musculatura longitudinal (Msl).

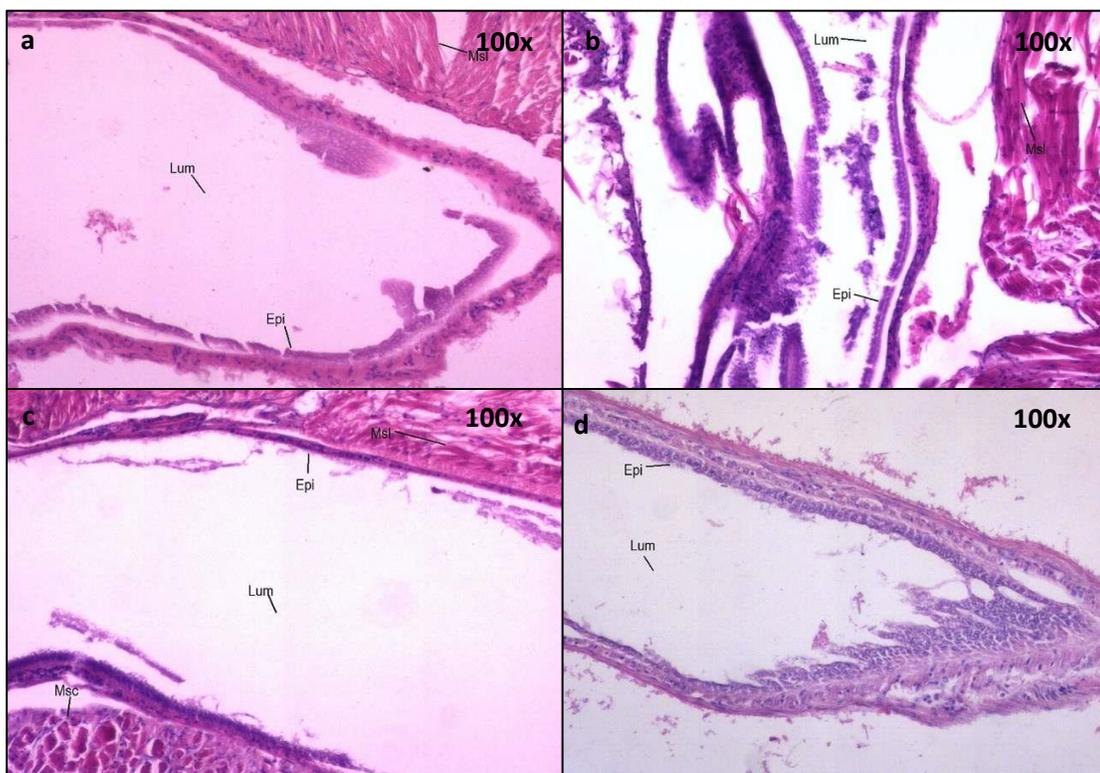


Figura 12.- Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) alimentado con una dieta con 20% de remplazo con harina de soya fermentada por un periodo de cuatro semanas. Lumen intestinal (Lum), epitelio intestinal (Epi), material celofán (Mc), musculatura circular (Msc) y musculatura longitudinal (Msl).

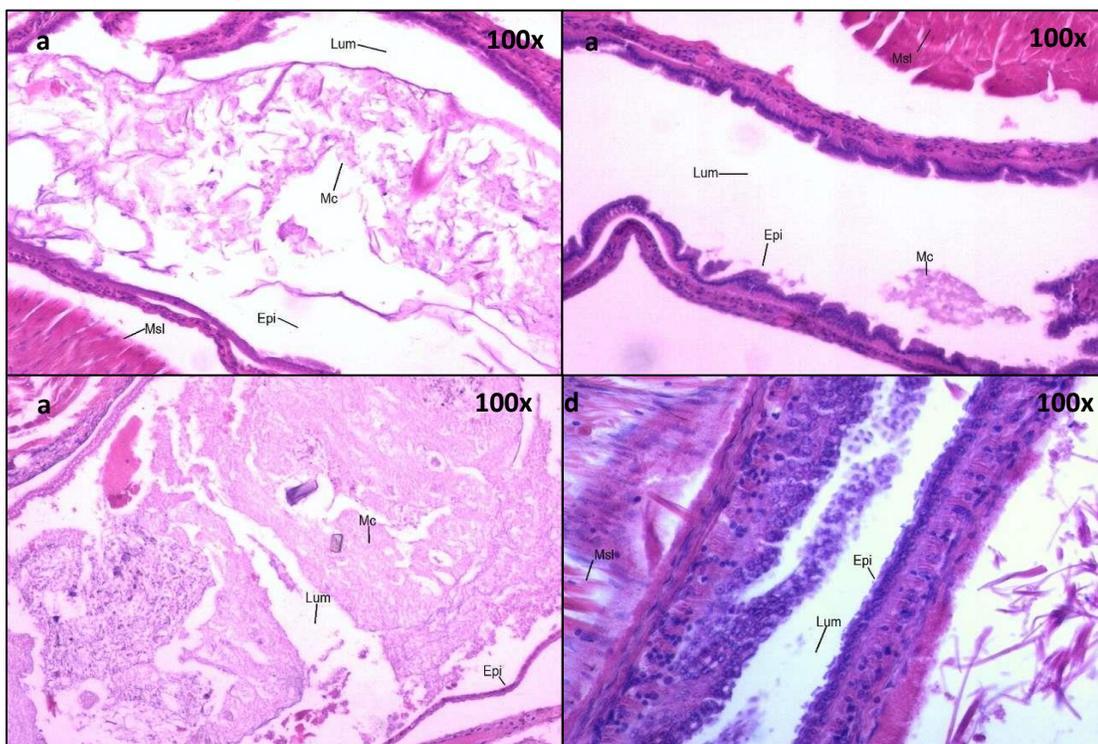


Figura 13.- Cortes histológicos longitudinales del intestino del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) alimentado con una dieta con 10% de remplazo con harina de soya fermentada por un periodo de cuatro semanas. Lumen intestinal (Lum), epitelio intestinal (Epi), material celofán (Mc), musculatura circular (Msc) y musculatura longitudinal (Msl).

3.7 Análisis económico

En la Tabla 8 se muestra el costo de producción de los ingredientes necesarios para la generación de una tonelada de harina de soya fermentada, el cual llega a un monto total de \$17,258.32 MNX.

Tabla 9.- Lista de costos de los insumos utilizados para la preparación de 1 tonelada de harina de soya fermentada con *S. boulardii*.

1 tonelada	
Ingredientes	Costo (mxn)
Harina de soya	\$ 7,812.35
Agua	\$ 7,009.50
Metionina	\$ 157.80
Grenetina	\$ 400.00
Vitamina C	\$ 514.00
Vitamina B6	\$ 239.00
Melaza	\$ 1,126.67
<i>S. boulardii</i> marca Floratil® (Biocodex, Francia)	\$ 186.00
Total	\$ 17,258.32

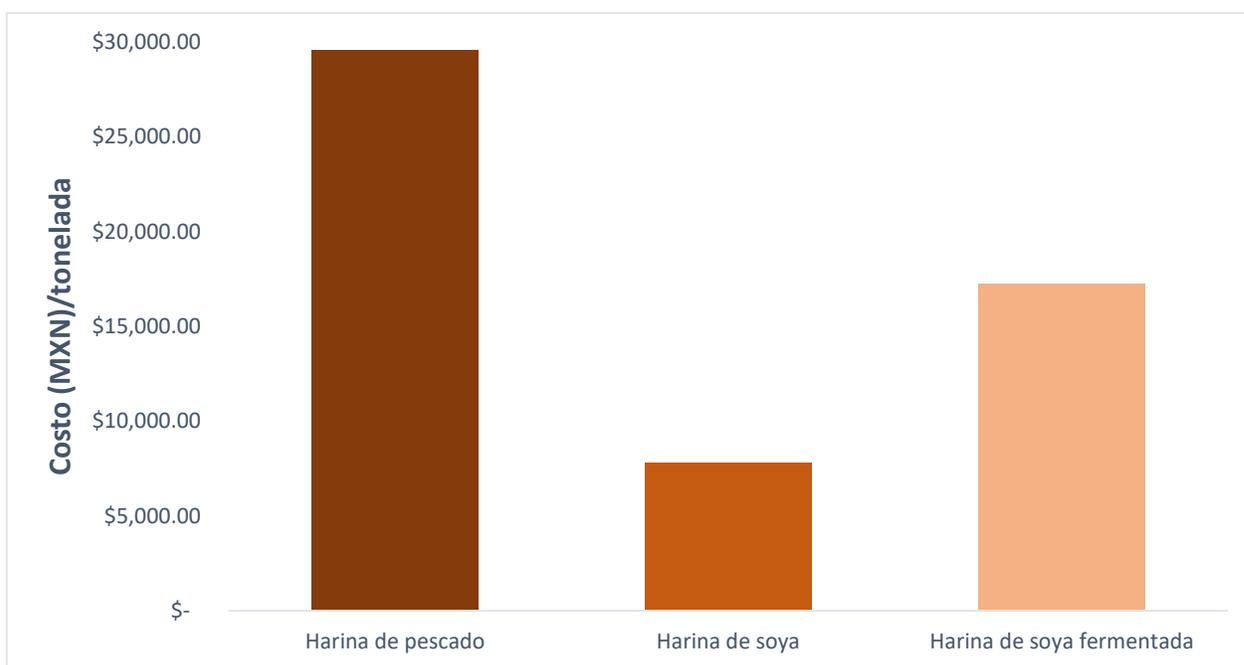


Figura 14.- Lista de costos por tonelada de la harina de pescado, harina de soya y harina de soya fermentada con *S. boulardii*.

Cabe de resaltar que esta evaluación no tomo en cuenta la mano de obra e instrumentos necesarios para la fabricación del fermento. En la figura 14, se muestra una comparativa de los precios de una tonelada de harina de pescado, harina de soya y el costo para producir una tonelada de harina de soya fermentada. Se observó que la harina de soya duplicó su precio al momento de ser fermentada, sin embargó, sigue siendo más asequible que la harina de pescado por un 71.46%.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Comparativa entre la harina de soya sin fermentar y la harina de soya fermentada con *S. boulardii*

Se observó que el proceso de fermentación de la harina de soya tuvo un efecto positivo en el ingrediente, debido al incremento en el contenido de proteínas y una disminución de los inhibidores de la tripsina. Si se comparan los resultados de este estudio con los obtenidos en el estudio realizado por Sharawy et al. (2016), se observa un comportamiento similar, tanto en el aumento del contenido proteico como en la reducción de inhibidores de tripsina, con una fermentación de la misma duración. El incremento del contenido proteico de la harina de soya fermentada se puede atribuir al crecimiento de *S. boulardii*. Teng et al. (2012) realizaron un estudio sobre los efectos en la harina de soya por la actividad metabólica de *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae* y también observaron un aumento del contenido de proteína al incremento de los organismos en la fermentación. Adicionalmente, Banerjee et al. (1999) reportaron que no hubo diferencias significativas cuando remplazaron parcialmente una dieta comercial con células bacterianas fototrópicas. Sus resultados indicaron que el porcentaje proteico aumentó con la inclusión de las bacterias fototrópicas en comparación con la dieta comercial.

En la presente investigación, el contenido de proteína en la harina de soya fue del 45.87%, mientras que el del producto final que contenía la harina de soya fermentada fue del 50.94%, es decir, un incremento del 5.07%. Es importante señalar que la fórmula para preparar el fermento incluía metionina y grenetina, los cuales contribuyeron, en parte, al aumento de la proteína en el producto final. Sin embargo, según la información nutrimental de la grenetina y metionina utilizadas en este estudio, la cantidad de nitrógeno aportada por estos ingredientes fue de 0.576 g en el producto final, los cuales representan un incremento de 0.49% de proteína, en comparación con la proteína en la harina de soya antes de fermentar. Tomando en cuenta lo anterior, se puede determinar que el proceso de fermentación por sí solo incrementó el contenido proteico en el producto final un 4.58%, en comparación con la proteína en la harina de soya antes de fermentar.

Con relación al porcentaje de los inhibidores de la tripsina en la harina de soya, se observó una disminución del 47% de inhibición en la harina de soya fermentada, a pesar de que la harina de soya sin fermentar no tenía una capacidad de inhibición de la tripsina importante. La reducción de la actividad d inhibición de la

tripsina puede estar relacionada con el proceso al que se sometió la soya durante su proceso de producción, por ejemplo, el uso de tratamientos térmicos con vapor húmedo o seco (Kaur et al., 2012). Estos métodos son eficientes debido a que los inhibidores de tripsina son termolábiles (sensibles a las temperaturas altas) y se desnaturalizan con las altas temperaturas, lo que mejora el valor nutricional de la harina de soya. La desventaja de este tipo de procedimiento es que, si no se tiene un buen control de la temperatura o de la duración del tratamiento, también se puede reducir la concentración de aminoácidos y provocar una menor digestibilidad en el ingrediente, ya que pueden ser transformados por la reacción Maillard (González et al., 2011).

A pesar de que existen métodos, como el mencionado anteriormente, para disminuir la cantidad de factores antinutrientes, la ventaja del proceso de fermentación es que no se desnaturaliza la proteína por procesos de térmicos, lo que lo hace un proceso más seguro para la industria. Además, la fermentación puede ser un proceso complementario para mejorar el valor nutricional de la harina de soya.

4.2 Desempeño biológico de los organismos

En este estudio, no se encontraron diferencias significativas entre las variables de respuesta evaluadas relacionadas al desempeño biológico de los organismos, lo que indica que el reemplazo parcial de hasta un 30% de alimento comercial con harina de soya fermentada con *S. boulardii* no afecta el crecimiento de *P. vannamei*. Estos resultados coinciden con lo reportado en otros estudios en los que se utilizó harina de soya fermentada como ingrediente en la formulación de dietas para *P. vannamei* y otros organismos (Lin & Mui, 2017; Kiers et al., 2003; Sharawy et al., 2016; Azarm & Lee, 2014; Yamamoto et al., 2010). Sin embargo, otros estudios han reportado un mayor crecimiento al incorporar harina de soya fermentada en las dietas de *P. vannamei* (Han et al., 2022; Shao et al., 2018). Se podría hipotetizar que en este estudio no se observaron diferencias significativas entre tratamientos debido a que el contenido de proteínas y lípidos, tanto de la dieta comercial como de las dietas formuladas con harina de soya fermentada, fue muy similar. Sin embargo, no se cuantificó el contenido de aminoácidos y ácidos grasos, por lo que es necesario realizar estos análisis para probar esta hipótesis.

Por otro lado, con respecto al crecimiento general de los organismos, aunque en el presente estudio se observó que los organismos del bioensayo presentaron un crecimiento similar al obtenido por otros autores (Hernández et al., 2004; Han et al., 2022), otros estudios han reportado crecimientos superiores durante esta etapa de cultivo (Shao et al., 2018). Existen diversos factores los cuales pudieron haber

afectado el desempeño de los organismos como: el estrés en los organismos, densidad de cultivo, enfermedades y preparación de las dietas. Cada uno de estos factores se describen a detalle a continuación.

4.2.1 Estrés por factores abióticos

A pesar de que el estrés es un proceso natural que dota a los organismos la capacidad de sobrevivir, también puede ser una condición desfavorable cuando la intensidad de estrés es mayor y puede ocasionar un estado de vulnerabilidad que limita el rendimiento del organismo (Chen & He, 2019; Zhou et al., 2010). Las variaciones ambientales son uno de los principales estresores para cualquier organismo cultivado, y pueden afectar el metabolismo, crecimiento, muda, sobrevivencia y el sistema inmune del camarón (Zhou et al., 2010). La temperatura es uno de los parámetros más importante ya que influye en el consumo de oxígeno de los organismos, además que está estrechamente relacionado con otros factores ambientes como el oxígeno disuelto y salinidad del sistema (Zhou et al., 2010). Los desechos nitrogenados, también se han asociado en la reducción de la tasa de crecimiento, supresión del sistema inmune y aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales (Abad et al., 2011). En este estudio, la temperatura, salinidad, OD, pH, NAT, nitritos y nitratos se mantuvieron estables durante todo el bioensayo y dentro del rango óptimo para el crecimiento de los organismos (Carbajal et al., 2013; Roque et al., 2020). Por lo tanto, el desempeño biológico de los camarones observado en el presente estudio no se puede atribuir a estrés ocasionado por factores abióticos.

4.2.2 Densidad de cultivo

Otro factor que afecta el desempeño biológico de un organismo es la densidad de cultivo. El camarón blanco es conocido por ser un organismo bastante resiliente lo que posibilita su cultivo en condiciones extensivas hasta hiper intensivas con riesgo de enfermedades, acumulación de desechos, deterioro de la calidad de agua y comportamientos adversos como el canibalismo (Bardera et al., 2021). Teniendo en cuenta que la superficie de cultivo de cada unidad experimental utilizada en el bioensayo fue de 0.0706 m², los 5 camarones sembrados en cada tanque de cultivo equivaldrían a una densidad de 70 organismos/m², por lo que la densidad pudo ser un factor que afectó el crecimiento de los organismos.

A este respecto, otros estudios han demostrado que el cultivo con densidades inadecuadas puede afectar significativamente el desempeño del camarón blanco. Por ejemplo, Bardera et al. (2021) evaluaron el efecto de tres densidades de cultivo (6.2, 12.4 y 24.8 organismos/ m²) en la producción de camarón blanco y observaron que el consumo del alimento aumentaba conforme mayor era la densidad de los tratamientos, siendo el tratamiento de densidad baja el que tuvo el peor desempeño. Además, se observó que en el tratamiento con densidad baja hubo un efecto de dominancia jerárquica entre los organismos. Los organismos dominantes pasaban menos tiempo en el área de comida, por lo cual disminuía el consumo de alimento. Además, se observó que los organismos dominantes exploraban toda la zona de cultivo. En el tratamiento con la mayor densidad, la dominancia jerarquía no fue evidente, debido a que las diferencias de tiempo en el área de comida entre los organismos dominantes y subordinados fueron similares. Por lo tanto, entre mayor sea la densidad de organismos en un cultivo, existe una menor dominancia jerárquica debido a competencia por el alimento. Kotiya y Vadher (2021) también estudiaron el efecto de la densidad de cultivo en el crecimiento diario, crecimiento específico, tasa de conversión alimenticia, tasa de conversión proteica y sobrevivencia de *P. vannamei*. En contraste con el estudio de Bardera et al. (2021), las densidades utilizadas fueron del 30, 40, 50, 60, 70 y 80 organismos/m² y se observó una relación inversa entre la densidad del cultivo y el desempeño de los organismos. La densidad utilizada en el presente estudio se puede comparar con la segunda densidad más alta utilizada por Kotiya y Vadher (2021). Por lo que el desempeño biológico de los camarones observado en el presente estudio se puede atribuir al estrés ocasionado por la densidad de cultivo.

4.2.3 Dietas experimentales

Un factor importante por considerar es que en este estudio se hizo un remplazo parcial de la dieta comercial completa, lo que significa que no solamente se sustituyó un ingrediente, sino el valor nutricional de la dieta comercial. A pesar de que las dietas experimentales utilizadas son relativamente isoproteicas e isolipídicas, no se realizaron los estudios necesarios para comprobar si las dietas experimentales cumplían con los niveles de aminoácidos, como la metionina y cisteína, y micronutrientes necesarios para el crecimiento óptimo del camarón blanco (Dersjant et al., 2002; Sookying et al., 2013). Sin embargo, la dieta control junto con las dietas experimentales tuvieron resultados similares con respecto al desempeño biológico del camarón, refutando que el valor nutricional de las dietas pudo haber afectado los parámetros de desempeño biológicos evaluados en este estudio.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los porcentajes de lixiviación de la dieta control y dietas experimentales fueron superiores al 20%, es posible que esta pérdida sí influyera en las tasas de crecimiento, ya que los camarones no consumen inmediatamente el alimento. Estos porcentajes de lixiviación tan altos pueden ser el resultado de los siguientes factores: que la molienda de los ingredientes no se haya efectuado como es debido, dejando partículas de alimento comercial o fermento con tamaños irregulares; que no se haya cumplido con requisitos de humedad y firmeza; problemas en el proceso de peletizado; un inadecuado proceso de post condicionamiento; o que no se haya utilizado de forma idónea el aglutinante (Tan y Dominy, 1997). En las maquinas peletizadoras y de extrusión se ejerce presión para que los ingredientes homogeneizados salgan por los dados. Dicha presión ocasiona que los ingredientes se compacten, evitando la formación de grietas o burbujas de aire dentro del pellet que se puedan formar durante el secado, generando una mayor impermeabilidad de las partículas de alimento. Además, la compactación aumenta la densidad de las partículas, lo que las hace más estables en el agua (Tan y Dominy, 1997). En este estudio, las dietas control y experimentales no fueron pelletizadas ni extruidas debido a la falta de accesorios y herramientas para realizar este proceso. Mas bien, las partículas de alimento se formaron mediante la trituración de la mezcla con una licuadora hasta que se obtuvieran un tamaño de migaja idóneo para el consumo de los organismos. Así mismo, a la mezcla se le añadió aglutinante para que la mezcla se mantuviera unida. Este proceso de manufactura pudo provocar la reducción de la estabilidad en agua de las dietas control y experimentales. Así mismo, hay que tomar en cuenta que el porcentaje de lixiviación pudo ser variable, ya que estos resultados se obtuvieron tras dejar el alimento sumergido en agua de mar por un lapso de 24 horas, por lo que no se sabe con certeza si el alimento alcanzó los porcentajes de lixiviación registrados al momento que el organismo consumía el alimento, teniendo en cuenta que no consumían el alimento al instante.

En relación con, el aglutinante, se utilizó la grenetina por su disponibilidad, precio y uso en las dietas para crustáceos. Además, Partridge y Southgate (1999) realizaron un estudio con larvas de *Lates calcarifer* (barramundi) en donde se analizó el efecto de diferentes aglutinantes en la asimilación e ingesta de la dieta. Se determinó que la grenetina se asimila de forma eficiente. También se analizó si la concentración del aglutinante (inclusión del 1, 2 y 3%) afectaba la lixiviación de las dietas y se demostró que los mejores niveles de inclusión fueron del 2 y 3%. Para las dietas utilizadas en este estudio, se agregó el equivalente al 5% del peso total de la dieta seca, ya que este se ha reportado como un nivel de inclusión aceptable (Cuzona et al., 1994).

Sin embargo, con el fin de evitar un efecto negativo en el crecimiento del camarón ocasionado por las propiedades físicas del alimento, se optó por alimentar a saciedad, como se describe a detalle en la sección

de Metodología. Por lo tanto, la lixiviación de las dietas fue un factor determinante en el consumo de alimento y nutrientes de los tratamientos, ocasionando altos niveles de FCA.

4.2.4 Condición sanitaria del sistema

Otro factor que pudo afectar el crecimiento de los organismos del presente estudio es la presencia del virus IHHNV en los organismos. El virus IHHNV es un patógeno que afecta significativamente el crecimiento de los organismos afectados, debido a que depende del metabolismo de su hospedero para su replicación, maximizando su replicación para sobrellevar los mecanismos de defensa del organismo infectado, causando así un mal desempeño en las funciones normales de los organismos (Galván et al., 2012). Así mismo, Galván et al. (2012) observaron que los organismos infectados presentaban una cantidad significativamente diferentes de sustratos energéticos (glucosa, lactato, triglicéridos y colesterol) en el plasma y el hepatopáncreas en contraste con los organismos libres de patógenos. Kalagayan et al. (1991) demostraron que el cultivo de camarones con IHHNV, puede ocasionar un alto porcentaje de variación de tallas entre organismos, lo que corresponde a una ineficiencia en el crecimiento, en comparación de los tratamientos control libres del virus. Además, Singhapan et al. (2004) observaron que los cultivos con IHHNV presentaban una disminución significativamente en la sobrevivencia y tasa de conversión alimenticia en comparación de los organismos libres de patógenos.

Se puede concluir que, debido a la falta de diferencias significativas entre los tratamientos, la inclusión de la harina de soya fermentada no fue un factor que comprometió el desempeño de los organismos. No obstante, la presencia del virus IHHNV en los organismos, así como el alto porcentaje de lixiviación de los tratamientos utilizados; son los que potencialmente impactaron el crecimiento y el factor de conversión alimenticia, respectivamente, de los organismos utilizados en este estudio.

4.3 Morfología del intestino

El intestino tiene 2 funciones significativas en la fisiología de un organismo: la digestión y absorción de los nutrientes del alimento. Se ha demostrado que los factores antinutricionales que contiene la soya, como los inhibidores de la tripsina, pueden perjudicar el balance de la microbiota y provocar una enteritis aguda generando inflamación y hinchazón en el intestino, lo que provoca un menor crecimiento de los organismos, debido al bajo consumo y aprovechamiento del alimento (Zhang et al., 2020). En los estudios

realizados en el *P. vannamei* por Zhang et al. (2020) se observó que los intestinos de los camarones que alimentados con dietas con alto remplazo de harina de pescado por harina de soya presentaron vellosidades epiteliales más cortas y una reducción de las capas musculares del intestino medio. Los daños en los tejidos observados en los organismos de la presente investigación no estuvieron relacionados con síntomas causados por una enteritis proveniente de la inclusión de la harina de soya fermentada ya que no se observaron índices de inflamación e hinchazón del intestino como exfoliación epitelial (Fuentes et al., 2017). Además, las alteraciones se observaron en todos los tratamientos, incluyendo el tratamiento control, lo que indica que los daños no fueron causados por la inclusión de la harina fermentada. Un motivo externo que pudo haber afectado a las muestras es el inadecuado proceso de preparación o el mal uso del equipamiento al momento de procesar las muestras histológicas, ya que la falta de experiencia en este tipo de técnicas puede afectar la calidad de la muestra hasta el punto de llegar a inutilizarlas (Leiva et al., 2018; Sedano, 1998). Por lo anterior, los daños encontrados en este estudio en todos los tejidos pudieron deberse a problemas durante el procesamiento de las muestras, ajenos a los tratamientos evaluados durante el bioensayo.

En relación con el virus IHNV, debido a que *P. vannamei* no presentó signos adversos, salvo la disminución del crecimiento, se puede descartar como el agente causal de los daños en el tejido intestinal debido a que no es un órgano o tejido donde usualmente ataca este virus, siendo estos las branquias, nódulos hematopoyéticos y los hemocitos, el cordón nervioso ventral y los ganglios, las células epiteliales del túbulo de la glándula antenal, el órgano linfoide, las células parenquimatosas, las células del tejido conjuntivo y los ovarios (OMSA, 2023).

4.4 Análisis de costos

En la presente investigación, se observó que a pesar de que el proceso de fermentación duplicó el precio en valor de la harina de soya, la soya fermentada sigue siendo significativamente más económico que la harina de pescado, generando un ahorro de \$12,334.57 MXN por tonelada. Además, se debe de considerar que el precio de la harina de pescado se encuentra en constante fluctuación debido a su dependencia a la pesca y que su demanda es mayor a la oferta (FAO, 2022). En los últimos años se ha regularizado el precio de la harina de pescado debido a la búsqueda de formas que utilicen el insumo de mejor manera o que aumenten su producción como el uso de los subproductos pesqueros. Sin embargo, la harina proveniente de los subproductos pesqueros tiene un valor nutricional diferente debido a que poseen menor proteína (FAO, 2022). Por otro lado, la harina de soya proporciona una mejor estabilidad en el mercado por su bajo

índice de fluctuación en su valor, gracias a sus altos niveles de producción, lo que proporcionan una mayor disponibilidad en el mercado (Krishnan & Jez, 2018). Cabe resaltar que las cantidades utilizadas y protocolo de fermentación utilizado para la preparación de la harina de soya fermentada no están estandarizadas, por lo que existe potencial para mejora que puede beneficiar el precio final del producto.

Capítulo 5. Conclusiones

El proceso de fermentación con *S. boulardii*, redujo un 47% la inhibición de la tripsina y aumentó un 4.54% el contenido de proteína cruda en base a la harina de soya antes de ser fermentada.

El crecimiento de los camarones alimentados con las dietas experimentales fue similar al de los alimentados con la dieta control, además, ninguna de las dietas ocasionó daños en el tejido intestinal o enteritis.

5.1 Consideraciones

De acuerdo con los resultados obtenidos, la lixiviación en las dietas fue un factor que a pesar de que se sabe que influenció en la TCA de los camarones, su efecto no se pudo determinar cuantitativamente debido a que no se tomaron muestras del alimento sobrante en los sistemas teniendo en cuenta que los camarones no consumen inmediatamente su alimento como los peces. Para evitar estas complicaciones, se debe realizar un estudio en el que se agregue la harina de soya fermentado en remplazo parcial de una dieta comercial o como ingrediente funcional de una dieta para *P. vennamei* preparada utilizando un extrusor o un pelletizador.

Además, para poder realizar el proceso de fermentación de la forma más controlada posible, se necesitan las herramientas y componentes que ayuden a controlar de mejor forma el sistema interno del biorreactor, debido a que los parámetros físicos y químicos son factores que tienen un efecto en el desarrollo de la fermentación.

El protocolo de fermentación utilizado no fue un proceso estandarizado, por lo que tiene la capacidad de mejora y de reducir los insumos utilizados. De igual manera, se pueden evaluar el uso de diferentes formas de fermentación como, por ejemplo, la fermentación en estado sólido.

Es necesario medir los niveles de aminoácidos y digestibilidad de la harina de soya antes y después de ser fermentada. Además, se recomienda analizar la capacidad del probiótico *S. boulardii* para colonizar la microbiota intestinal de los organismos y el sistema de cultivo.

Literatura citada

- Abad, S., Betancourt, M., Vargas, F. y Roque, A. (2011). Interaction of physical, chemical and biological factors in shrimp culture. *Avances en Acuicultura y Manejo ambiental*. 151-164. <https://www.researchgate.net/publication/252931386>
- Amaya, E. A., Davis, D. A. y Rouse, D. B. (2007). Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*. 262(2-4), 393-401. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.11.015>
- Association of official analytical chemists. (2006). Official methods of analysis of AOAC international. AOAC International. https://www.researchgate.net/publication/292783651_AOAC_2005
- Bae, J., Hamidoghli, A., Djaballah, M. S., Maamri, S., Hamdi, A., Souffi, I., Farris, N. W. y Bai, S. C. (2020). Effects of three different dietary plant protein sources as fishmeal replacers in juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 23(1). <https://doi.org/10.1186/s41240-020-0148-x>
- Bardera, G., Owen, M. A. G., Façanha, F. N., Alcaraz-Calero, J. M., Alexander, M. E. y Sloman, K. A. 2021. The influence of density and dominance on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding behaviour. *Aquaculture*. 531. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735949>
- Carbajal Hernández, J. J., Pastor, L. y Fernández, S. (2013). Diagnóstico y predicción del hábitat en la camaricultura. *Computación y Sistemas*. 17(3), 435-455. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-55462013000300014
- Castro, M. y Rodríguez, F. (2005). Levaduras: Probióticos y Prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica*. 6(1), 26-38. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945018004>
- CESAIBC (Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California). (2010). Protocolo de prevención y contingencias para el cultivo de camarín en Baja. Ensenada, Baja California. <https://www.cesaibc.org/sitio/protocolo.php>
- Chen, Y. H. y He, J. G. (2019). Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 84, 744-755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.069>
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca). (2021). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca 2021. Mazatlán, Sinaloa. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Czerucka, D., Piche, T. y Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *An Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 26(6), 767-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N. y Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(34), 125-137. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2008.02.019>

- Dersjant-Li, Y. (2002). The use of soy protein in aquafeeds. *Avance en Nutrición Acuícola*, 6, 541-558. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/258>
- Elizalde, A. de D., Porrilla, Y. P. y Chaparro, D. C. C. (2009). Factores Antinutricionales en Semillas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1), 45-54. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612009000100007&lng=en&tlng=es
- El-Sayed, A.-F. M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* En *Aquaculture*, 179, 149-168. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00159-3)
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2023). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_whitelegshrimp.htm
- Farinazzo, F. S., Farinazzo, E. S., Spinosa, W. A., y Garcia, S. (2017). *Saccharomyces boulardii*: Optimization of simultaneous saccharification and fermentation of cell production in organic and conventional apple substrate pulp. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 969-977. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0123-1>
- Fuentes-Quesada, J. P., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Viana, M. T., Lazo, J. P. y Mata-Sotres, J. A. (2017). Enteritis Inducida por la Harina de Soya en las Dietas de Peces Marinos: Efectos Sobre la Integridad del Intestino Distal y la Respuesta Inmune en *Totoaba macdonaldi*. *Avances en Nutrición Acuicola*. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/29>
- Galván-Alvarez, D., Mendoza-Cano, F., Hernández-López, J. y Sánchez-Paz, A. (2012). Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp *Penaeus vannamei* induced by the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.06.005>
- Gilani, G. S., Xiao, C. W. y Cockell, K. A. (2012). Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *British Journal of Nutrition*, 108, 315-332. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002371>
- Godínez, D., González, O., Hernández, A., García, A., Gamboa, J., Arce, J., y Godínez, E. (2012). Principales patógenos virales de camarón en América y su relación con ambientes de baja salinidad. *Ra Ximhai*, 8(3), 61-69. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125176005>
- González-Vega, J. C., Kim, B. G., Htoo, J. K., Lemme, A. y Stein, H. H. (2011). Amino acid digestibility in heated soybean meal fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 89(11), 3617-3625. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3465>
- Hossain, M. N., Afrin, S., Humayun, S., Ahmed, M. M., y Saha, B. K. (2020). Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste. *Frontiers in Nutrition*, 7, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00027>
- Hulefeld, R., Habte-Tsion, H. M., Lalgudi, R. S., McGraw, B., Cain, R., Allen, K., Thompson, K. R., Tidwell, J. H. y Kumar, V. (2018). Nutritional evaluation of an improved soybean meal as a fishmeal replacer

- in the diet of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 49(4), 1414-1422. <https://doi.org/10.1111/are.13593>
- Indexmundi. (30 de junio de 2024). Harina de soya precio mensual-Peso mexicano por tonelada. Indexmundi. <https://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/?mercancia=harina-de-soja&meses=240&moneda=mxn>
- Indexmundi. (30 de junio de 2024). Harina de pescado precio mensual-Peso mexicano por tonelada. Indexmundi. <https://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/?mercancia=harina-de-pescado&moneda=mxn>
- ISO (International Standard Organization. (2001). *Animal feeding stuffs-Determination of trypsin inhibitor activity of soya products*. Switzerland. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94a1ab3a-dad3-4b12-8fae-bb42ef625e4a/iso-14902-2001>
- Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J. y Brock, J. (1991). IHHN Virus as an Etiological Factor in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of Juvenile *Penaeus vannamei* Cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22(4), 235-243. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1991.tb00740.x>
- Kaur, S., Sharma, S., Dar, B. N. y Singh, B. (2012). Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. *Food Science and Technology International*, 18(5), 445-454. <https://doi.org/10.1177/1082013211428236>
- Kotiya, A. S. y Vadher, K. H. (2021). Effect of different stocking density on growth, survival on *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in summer and monsoon crop in province of Gujarat States in India. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 7(3), 71-99. <https://doi.org/10.18331/sfs2021.7.3.7>
- Krishnan, H. B. y Jez, J. M. (2018). Review: The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. *Plant Science*, 272,14-21. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.030>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elseiver. <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts>
- Leiva-Cepas, F., Ruz-Caracuel, I., Peña-Toledo, M. A., Agüera-Vega, A., Jimena, I., Luque, E., Peña, J. y Peña Amaro, J. (2018). Metodología de laboratorio para el estudio histológico del músculo esquelético. *Arch Med Deporte*, 35(4), 253-262. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6767351>
- Leyva Ordaz Guillermo Antonio, Lizza Gaxiola Sáenz y Guevara Escamilla Sergio. (2010). *Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad*. www.cesaibc.org
- Lozada-Salcedo, E., Núñez-Torres, O., Rosero-Peñaherrera, M. y Aragadvay-Yungan, R. (2017). Efectos fisiopatológicos de los compuestos secundarios en la alimentación de monogástricos. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(1), 82-92. http://scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2311-25812017000100007
- Madigan, T., Martinko, M., Bender, S., Buckley, H. y Stahl, A. (2015). *Brock Biología de los Microorganismos*. Pearson. https://www.academia.edu/39077515/Biolog%C3%ADa_de_los_microorganismos_BROCK

- MAG (Ministerio de agricultura y ganadería). (2011). Manual Básico de Piscícola. Paraguay. https://1library.co/document/go5nvkmj-manual-b%C3%A1sico-de-sanidad-piscicola.html#google_vignette
- Martínez, L., Martínez, M. y Cortés, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 25(3), 181-196. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000300006&lng=es&tlng=es.
- Mas, A., Beltran, G. y Torija, M. (2020). Microbiological control of alcoholic fermentation. *Ecocycles*, 6(2), 57-72. <https://doi.org/10.19040/ecocycles.v6i2.181>
- Medina, A. J. (2019). Fermentación De La Miel Para Obtención De Hidromiel. *Revista Infometric@-Serie Ingeniería. En Básicas y Agrícolas*, 1(1). <https://www.infometrica.org/index.php/syh/article/view/63>
- NRC (National Research Council). (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press. Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/13039>.
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua, J. y Contreras, R. (2011). Functional Feed Assessment on *Litopenaeus vannamei* Using 100% Fish Meal Replacement by Soybean Meal, High Levels of complex carbohydrates and Bacillus probiotic strains. *Marine Drugs*, 9(6), 1119-1132. <https://doi.org/10.3390/md9061119>
- Olmos, J. (2021). Feed intake improvement, gut microbiota modulation and pathogens control by using *Bacillus* species in shrimp aquaculture. *World journal of microbiology biotechnology*, 37(28). <https://doi.org/10.1007/S11274-020-02987-Z>
- OMSA (Organización Mundial de Sanidad Aniamal). (2023). Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>
- Partridge, G. y Southgate, P. (2001). The effect of binder composition on ingestion and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calcarifer* Bloch larvae. *Aquaculture Research*, 30(11-12), 879-86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00418.x>
- Patra, S. y Mohamed, K. (2003). Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International*, 11(5), 505-514. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000004193.40039.54>
- Peisker, M. (2001). Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. *Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food*, 54. 103-107. <https://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=1600017>
- Powell, C., Tansil, F., France, J. y Bureau, D. (2020). Growth trajectory analysis of Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Comparison of the specific growth rate, the thermal-unit growth coefficient and its adaptations. *Aquaculture Research*, 51(2), 480-489. <https://doi.org/10.1111/are.14391>
- Roque-Salinas, L., Canales Machado, M., Cáceres-Quiro, O., Flores-Romero, J., Cea-Navas, N. y Hernández-Dimas, V. (2020). Comparación del crecimiento del camarón blanco en dos condiciones de estudio,

- salinidad óptima y salinidad cercana a cero. *Ciencia e Interculturalidad*. 26(01). 132-147. [10.5377/rci.v26i01.9890](https://doi.org/10.5377/rci.v26i01.9890)
- Sablayrolles, J. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- Sedano, E. y Neira, C. (1998). Calidad y Control de Calidad en el Laboratorio de Procedimientos Histológicos del Departamento de Patología. *Anales de la Facultad de Medicina*, 59(2), 145-154. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v59i2.4639>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2021). Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios. Panorama Internacional de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Fusariosis de las musáceas). México. https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/octubre/PAIFocR4TFusariosidelasmus%C3%A11ceas121021_6ee3e476-f25c-4658-905e-f6710c35877a.pdf
- Shan, C., Chen, L. (1990). Growth characteristics and relationships among body length, body weight and tail weight of *Penaeus monodon* from a culture environment in Taiwan. *Aquaculture*, 91(3,4), 253-263. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90192-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90192-P)
- Sharawy, Z., Goda, A., y Hassaan, M. (2016). Partial or total replacement of fish meal by solid state fermented soybean meal with *Saccharomyces cerevisiae* in diets for Indian prawn shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 90-99. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2015.12.009>
- Singhapan, J., Limsuwan, C., y Chuchird, N. (2004). Effect of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) on Growth, Survival Rate and Histopathological Changes of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Agriculture and Natural Resources*, 38(2), 236-240. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/242955>
- Soares, M., Fracalossi, D., Lima, L., Rodrigues, M., Redig, J., Mouriño, J., Seiffert, W., y Vieira, F. (2015). Replacement of fish meal by protein soybean concentrate in practical diets for Pacific white shrimp. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 44(10), 343-349. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902015001000001>
- Sookying, D., Davis, D. A., y Soller, F. (2013). A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19(4), 441-448. <https://doi.org/10.1111/anu.12050>
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Acosta, B. y Real, F. (2009). Uso de probiótico en Acuicultura. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*, 6-7, 51-54. <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/290827>
- Sundaram, M., Panigrahi, A., Ganesh, J., Nila, P., Sivagnanam, S., Rajamanickam, S. y Gopal, C. (2017). Evaluation of different probiotic strains for growth performance and immunomodulation in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* boone, 1931. *Indian Journal of Fisheries*, 64, 89-96. <https://doi.org/10.21077/ijf.2017.64.special-issue.76210-13>
- Teng, D., Gao, M., Yang, Y., Liu, B., Tian, Z., y Wang, J. (2012). Bio-modification of soybean meal with *Bacillus subtilis* or *Aspergillus oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2011.08.005>

- Tomicic, Z., Colovic, R., Cabarkapa, I., Vukmirovic, D., Djuragic, O. y Tomicic, R. (2016). BENEFICIAL PROPERTIES OF PROBIOTIC YEAST *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43(2), 103-110. <https://doi.org/10.5937/ffr1602103t>
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Médica Panamericana. <https://books.google.es/books?id=Nxb3iETuwplC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Tovar, D. (2008). Probióticos en Acuicultura: Avances Recientes del Uso de Levaduras en Peces Marinos. *Avances en Nutrición Acuícola*, 5, 237-257(327-357). https://www.researchgate.net/publication/266407094_Probioticos_en_Acuicultura_Avances_Recientes_del_Uso_de_Levaduras_en_Peces_Marinos
- Vázquez, H. J. y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingengería, investigación y tecnología*, 8(4), 249-259. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004&lng=es&tlng=es.
- Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L. y Quentel, C. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258(1-4), 470-478. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.002>
- Zhang, J. J., Yang, H. L., Yan, Y. Y., Zhang, C. X., Ye, J.D. y Sun, Y. Z. (2020). Effects of fish origin probiotics on growth performance, immune response and intestinal health of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal. *Aquaculture Nutrition*, 26(4), 1255-1265. <https://doi.org/10.1111/anu.13081>
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W. N., He, W. Y., Wang, A. L. y Liu, Y. (2010). Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology*, 35(6), 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.06.004>

Anexo A

Tabla 10.- Lista de reactivos utilizados para el análisis de inhibición de tripsina.

Reactivo	Preparación
Solución de cloruro de calcio	Disolver 735 mg de cloruro de calcio hidratado en un litro de ácido clorhídrico al 0.001 mol/l. Verificar el pH este en 3
Solución stock tripsina	Permitir que la tripsina llegue a temperatura ambiente. En un matraz volumétrico de 100 ml, disolver 27 mg de tripsina en la solución de cloruro de calcio. Cuenta con un tiempo de uso de 5 días
Solución trabajo tripsina	En un matraz volumétrico de 100 ml, pipetear 5 ml de la solución stock tripsina y aforar con solución de cloruro de calcio
Tris buffer/solución de cloruro de calcio	Disolver 6.05 gr de Tris-(hidroximetil) aminometano y 735 mg de cloruro de calcio hidratado en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH de 8.2 con ácido clorhídrico al 6 mol/l. Ajustar la solución a 1 litro con agua destilada
Reactivo L-BAPA	El reactivo debe de prepararse en el mismo día de uso. En un matraz volumétrico de 100 ml, disolver 60 mg de L-BAPA en 1 ml de DMSO y aforar con Tris buffer/solución de cloruro de calcio

Anexo B.-

Metodología para la realización de la curva de calibración de la inhibición de tripsina/medición de la actividad de tripsina

Se realizó una curva de calibración para afirmar que los reactivos, en especial la solución trabajo de tripsina, sean viables para utilizar. A continuación, se mostrarán los pasos para realizar la curva de calibración.

Tabla 11.- (1a) Verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos de centrifuga.

Reactivos	Blanco (ml)	Muestra 1 (ml)	Muestra 2 (ml)	Muestra 3 (ml)	Muestra 4 (ml)	Muestra 5 (ml)
L-BAPA (anexo A)	5	5	5	5	5	5
Agua	3	3	3	3	3	3
Ácido acético 5.3 mol/l	1	0	0	0	0	0

Tabla 12.- (2) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos.

Reactivos	Blanco (ml)	Muestra 1 (ml)	Muestra 2 (ml)	Muestra 3 (ml)	Muestra 4 (ml)	Muestra 5 (ml)
Solución de trabajo tripsina (anexo A)	0	0.6	0.5	0.3	0.2	0.1
Agua	1	0.4	0.5	0.7	0.8	0.9

Tabla 13.- (3a) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos.

Reactivos	Blanco (ml)	Muestra 1 (ml)	Muestra 2 (ml)	Muestra 3 (ml)	Muestra 4 (ml)	Muestra 5 (ml)
Ácido acético 5.3 mol/l	0	1	1	1	1	1

4. Mezclar el contenido con un mezclador de tubos y centrifugar por 10 minutos a una aceleración radial de 1500.
5. Pipetear 250 microlitros por triplicado de cada una de las muestras en una microplaca para realizar la lectura en un lector de microplacas a una longitud de onda de 410 nanómetros.

Para poder comparar del porcentaje de inhibición de tripsina de la harina antes y después de ser fermentada, es necesario encontrar un volumen de sobrenadante de la harina de soya que tenga la capacidad de inhibir entre 40-60% de la tripsina. Por lo cual, se prepararon un total de 4 muestras con diferentes volúmenes de sobrenadante para determinar el porcentaje de inhibición de la tripsina. A continuación, se mostrarán los volúmenes utilizados para cada una de las muestras.

Tabla 14.- Cantidad de sobrenadante y agua destilada utilizada para la comparación de inhibidores de tripsina.

Reactivos	Blanco	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Sobrenadante (ml)	0	0.2	0.4	0.8	1
Agua destilada (ml)	1	0.8	0.6	0.2	0

A continuación, se mostrarán los pasos para realizar el análisis de inhibición de la tripsina

Tabla 15.- (1b) Verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos de centrifuga.

Reactivos	Blanco estándar (ml)	Estándar (ml)	Blanco muestra (ml)	Muestra 1 (ml)	Muestra 2 (ml)	Muestra 3 (ml)	Muestra 4 (ml)
L-BAPA (anexo A)	5	5	5	5	5	5	5
Muestra diluida	0	0	1	1	1	1	1
Agua	3	3	2	2	2	2	2
Ácido acético 5.3 mol/l	1	0	1	0	0	0	0

Tabla 16.- (2b) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos.

Reactivos	Blanco estándar (ml)	Estándar (ml)	Blanco muestra (ml)	Muestra 1 (ml)	Muestra 2 (ml)	Muestra 3 (ml)	Muestra 4 (ml)
Solución de trabajo tripsina (anexo A)	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 17.- (3b) Mezclar los reactivos ya vertidos en los tubos con mezclador de tubos y colocar los tubos en baño María a 37 °C por 10 minutos. Tras pasar dicho tiempo, verter los siguientes reactivos en sus correspondientes tubos.

Reactivos	Blanco estándar (ml)	Estándar (ml)	Blanco muestra (ml)	Muestra 1 (ml)	Muestra 2 (ml)	Muestra 3 (ml)	Muestra 4 (ml)
Ácido acético 5.3 mol/l	0	1	0	1	1	1	1

4. Mezclar el contenido con un mezclador de tubos y centrifugar por 10 minutos a una aceleración radial de 1500.

5. Pipetear 250 microlitros por triplicado de cada una de las muestras en una microplaca para realizar la lectura en un lector de microplacas a una longitud de onda de 410 nanómetros.

Anexo C**Tabla 18.-** Deshidratación en procesador de tejidos.

Reactivo	Horas
<i>Etanol 70%</i>	1
<i>Etanol 96%-I</i>	2
<i>Etanol 96%-II</i>	2
<i>Etanol 100%-I</i>	2
<i>Etanol 100%-II</i>	2
<i>Etanol 100%-III</i>	1
<i>Benceno I</i>	2
<i>Benceno II</i>	2
<i>Parafina I</i>	2
<i>Parafina II</i>	2
<i>Parafina III</i>	1
Total	19

Anexo D**Tabla 19.-** Desparafinación de muestras.

Reactivo	Tiempo
<i>Xileno I</i>	10 minutos
<i>Xileno II</i>	10 minutos
<i>Etanol 100%</i>	15-20 inmersiones
<i>Etanol 95%</i>	15-20 inmersiones
<i>Etanol 70%</i>	15-20 inmersiones
<i>Etanol 50%</i>	15-20 inmersiones
<i>Etanol 30%</i>	15-20 inmersiones
<i>Agua corriente</i>	Hasta remover el exceso de alcohol

Anexo E

Tabla 20.- Tinción Hematoxilina & Eosina.

Reactivo	Tiempo
<i>Hematoxilina de Harris</i>	5 minutos
<i>Agua corriente (lavado)</i>	2 minutos
<i>Alcohol ácido (0.3 ml HCl/200 ml Etanol 70%)</i>	1 minuto
<i>Agua corriente (lavado)</i>	4-5 minutos
<i>Carbonato de Litio</i>	1 minuto
<i>Agua corriente (lavado)</i>	3 minutos
<i>Agua destilada (enjuague)</i>	
<i>Etanol 96%</i>	1 minuto
<i>Eosina "Y"</i>	40 segundos (agitación lenta)
<i>Etanol 95%-I</i>	15 inmersiones
<i>Etanol 95%-II</i>	15 inmersiones
<i>Etanol 100%-I</i>	15 inmersiones
<i>Etanol 100%-II</i>	15 inmersiones
<i>Xileno I</i>	3 minutos
<i>Xileno II</i>	8 minutos