

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural



**EFFECTO DE LA ALIMENTACIÓN DE LA DORADA
(*Sparus aurata*, L.) CON PIENSOS SIN HARINAS DE
PESCADO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS
DIGESTIVAS**

TRABAJO FINAL DE GRADO

CURSO 2016/2017

Autora:

Míriam Gutiérrez Vela

Tutoras:

Silvia Martínez Llorens

Ana Tomás Vidal

Título

Efecto de la alimentación de dorada (*Sparus aurata*, L.) con piensos sin harina de pescado sobre la actividad de enzimas digestivas.

Resumen

La dorada es la especie que más se produce en el mediterráneo, pero la caída en el precio de venta está disminuyendo la rentabilidad de la producción. Por otro lado, la alimentación supone uno de los mayores costes en la producción de especies acuícolas. Por lo tanto, la disminución de los costes por alimentación, como incluir fuentes de proteínas alternativas más baratas que la harina de pescado, resulta una alternativa para mejorar la rentabilidad de la producción.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la sustitución de la harina de pescado por una mezcla de harinas animales y vegetales (harina de carne de cerdo ibérico, harina de soja, de guisante y de girasol), en la actividad enzimática digestiva de la dorada (*Sparus aurata*). Para ello, se han ensayado 5 piensos experimentales, un pienso control cuya única fuente proteica era la harina de pescado, dos piensos con sustitución parcial de harina de pescado del 75% y el 90%, y dos piensos con sustitución completa de harina de pescado, uno de ellos enriquecido con la microalga *Isochrysis galbana*.

Para determinar la eficiencia digestiva de los piensos, a través de la evaluación de la actividad enzimática, se ha realizado un análisis de tres peces por tanque, nueve por pienso, de los siguientes enzimas digestivos: proteasas ácidas en el estómago, tripsina, amilasa, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa.

Los resultados muestran que la sustitución de harinas de pescado por la mezcla de harinas de origen vegetal y harina de carne de cerdo ibérico, en el caso de la actividad de la pepsina, no produjo cambios en los diferentes piensos. En cuanto a la fosfatasa alcalina, su actividad se ha visto favorecida mayoritariamente debido a un suplemento de fosfato cálcico en el pienso. La actividad de la α -amilasa es mayor cuanto mayor es el porcentaje de sustitución de harinas de pescado debido al contenido de almidón en las harinas de origen vegetal. La leucina aminopeptidasa presentó un aumento en la actividad con piensos de sustitución del 90% y 100% de harina de pescado. Sin embargo, la actividad de la tripsina se vio afectada por la sustitución de harina de pescado en el pienso, presentando una baja actividad con sustituciones de harina de pescado mayores del 75%.

Palabras clave: dorada, harina de pescado, harina de cerdo ibérico, mezcla proteica vegetal, tripsina, amilasa, fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, pepsina.

Alumna: Míriam Gutiérrez Vela.
Tutoras: Silvia Martínez Llorens.
Ana Tomás Vidal.

Valencia, Septiembre de 2017

Title

Effect of gilt-head bream feeding (*Sparus aurata*, L.), with diets without fish-meal about the activity of digestive enzymes.

Summary

The gilt-head bream is the most produced species in the Mediterranean, but its sales price is decreasing with the consequence of profit production reduction. On the other hand, feeding is one of the biggest costs in the production of aquaculture species. Therefore, to reduce the feed costs, such as increasing the dietary levels of alternative sources cheaper than fishmeal, is an alternative to improve the profitability of production.

The objective of this study is to assess the effect on the fish-meal replacement by a mixture of vegetables and animal meal (meal of Iberian pork, soybean meal, from peas and sunflower meal) in the digestive enzymatic activity of the gilt-head bream (*Sparus aurata*). To test that, 5 experimental diets have been tested, one diet control whose only protein source was fish-meal, two diets, 75% and 90%, dietary fish meal substitution, respectively and two diets with total fish-meal substitution, one of them enhanced with the micro-algae *Isochrysis galbana*.

To determinate the digestive efficiency of the diet, though the evaluation of the enzymatic activity, an analysis of three fish per tank has been done, nine each diet, by the following digestive enzymes: stomach acid proteases, trypsin, amylase, alkaline phosphatase and leucine aminopeptidase.

The results show that the dietary fish-meal substitution by the mixture of vegetable and Iberian pork meal, in the case of pepsin activity, did not produce changes in its diet. In terms of alkaline phosphatase, its activity has been mostly favored due to a calcium phosphate supplement in the diet. The α -amylase activity is higher when the percentage of fish-meal substitution is higher due to of the starch content in the vegetable meal. The leucine aminopeptidase showed an increase in the activity with substitution diets of 90% and 100% of fish-meal. However, trypsin activity was affected by the fish-meal substitution in diets, showing a low activity when fish-meal substitutions were higher than 75%.

Keywords: gilt-head bream, fish meal, Iberian pork meal, protein vegetal mixture, trypsin, amylase, alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase, pepsin.

Student: Míriam Gutiérrez Vela.
Tutors: Silvia Martínez Llorens.
Ana Tomás Vidal.

Valencia, September 2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA	1
1.2. PRODUCCIÓN DE LA DORADA.....	4
1.3. PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LAS HARINAS DE PESCADO.....	4
1.4. FUENTES PROTEICAS ALTERNATIVAS.....	5
1.4.1. Harinas de origen vegetal.....	6
1.4.2. Harinas de origen animal.....	7
1.4.3. Otros aditivos para mejorar los resultados de los piensos con bajo contenido en harina de pescado: piensos funcionales.....	8
1.5. FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS DIGESTIVAS	9
1.6. FACTORES QUE AFECTAN A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. INSTALACIONES.....	15
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
3.2.1. Obtención y manejo de los animales	16
3.2.2. Piensos experimentales.....	17
3.3. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS	18
3.4. ANÁLISIS ENZIMAS.....	19
3.4.1. Análisis de pepsina	19
3.4.2. Análisis tripsina.....	20
3.4.3. Análisis de α -amilasa	20
3.4.4. Análisis de la fosfatasa alcalina (ALP).....	21
3.4.5. Análisis de la leucina aminopeptidasa (LAP)	21
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
4. RESULTADOS	22
4.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR SECCIÓN	22
4.1.1. Tripsina	22
4.1.2. α -amilasa	22
4.1.3. Fosfatasa alcalina (ALP)	23
4.1.4. Leucina aminopeptidasa (LAP)	23
4.2. EFECTO DEL PIENSO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	24
4.2.1. Pepsina	24
4.2.2. Tripsina	24
4.2.3. α -amilasa	25
4.2.4. Fosfatasa alcalina (ALP)	26
4.2.5. Leucina aminopeptidasa (LAP)	26
4.3. EFECTO DEL PIENSO Y LA SECCIÓN intestinal sobre LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	27
4.3.1. Tripsina	27
4.3.2. α -amilasa	28
4.3.3. Fosfatasa alcalina (ALP)	28
4.3.4. Leucina aminopeptidasa (LAP)	29
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo de 1950-2014 (APROMAR, 2016).....	1
Figura 2. Producción en 2014 de productos acuáticos a través de la pesca y acuicultura (APROMAR, 2016).	2
Figura 3. Distribución de la producción de acuicultura en los estados miembros de la Unión Europea por su cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2014 (APROMAR, 2016)....	3
Figura 4. Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas y por especies, en el periodo 1960-2014 (APROMAR, 2016).....	3
Figura 5. Evolución de la producción acuícola de dorada (<i>Sparus aurata</i>) en España (1990-2015), (APROMAR, 2016).	4
Figura 6. pH y temperaturas óptimas de las principales enzimas estomacales y pancreáticas en los peces (Guillaume et al. 2002)	12
Figura 7. Distribución de los tanques de la línea 2 en el LAC. Fuente: Imagen del Grupo de Acuicultura y Biodiversidad de la UPV.	15
Figura 8. Actividad de la tripsina en las diferentes secciones intestinales.	22
Figura 9. Actividad de la α -amilasa en las diferentes secciones intestinales.....	22
Figura 10. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en las diferentes secciones intestinales.	23
Figura 11. Actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP) en las diferentes secciones intestinales.	23
Figura 12. Actividad de la pepsina según el pienso experimental suministrado.	24
Figura 13. Actividad de la tripsina según el pienso experimental suministrado.....	25
Figura 14. Actividad de la α -amilasa según el pienso experimental suministrado.....	25
Figura 15. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) según el pienso suministrado.....	26
Figura 16. Actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP) según el pienso suministrado.	26
Figura 17. Efecto del pienso y la sección en la actividad de la tripsina.....	27
Figura 18. Efecto del pienso y la sección en la actividad de la α -amilasa.	28
Figura 19. Efecto del pienso y la sección en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP).....	29
Figura 20. Efecto del pienso y la sección en la actividad de leucina aminopeptidasa (LAP).....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales países productores de acuicultura por toneladas anuales en 2014 y tasa de variación interanual (APROMAR, 2016).	2
Tabla 2. Coeficientes de digestibilidad aparente (%) de la proteína de distintas materias primas animales y vegetales en la dorada (Moyano y Alarcón, 1997).	6
Tabla 3. Sitios de acción de las principales enzimas proteolíticas de los peces (Guillaume et al. 2002).	10
Tabla 4. Resumen de los datos iniciales del experimento.	17
Tabla 5. Formulación y composición de los piensos experimentales	18
Tabla 6. Resultados globales de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales durante los 114 días que duró el experimento (valores de medias \pm error estándar de la media).	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA

Según el informe de APROMAR de 2016, la producción acuícola a nivel mundial en 2014 aumentó 10,1 millones de toneladas, con un valor de más de 132.815 millones de euros.

El consumo per cápita mundial de productos acuáticos ha pasado de 9,9 kg en 1960 a 19,2 kg actualmente, y uno de los motivos más importantes es el aumento de la producción de alimentos acuáticos.

Las capturas mundiales de la pesca extractiva se han estabilizado en los últimos 20 años en torno a los 90 millones de toneladas anuales, esta estabilización de la pesca en unos niveles casi imposibles de superar junto con el aumento de la demanda de productos acuáticos, es lo que ha impulsado el desarrollo de la acuicultura para el abastecimiento mundial de estos alimentos.

La producción de acuicultura en 2014 fue de 101,1 millones de toneladas, superando así a la pesca en 6,5 millones de toneladas (Figura 1). El porcentaje de producción de acuicultura en 2014 fue del 51,7% frente al 48.3% que supuso la pesca (Figura 2).

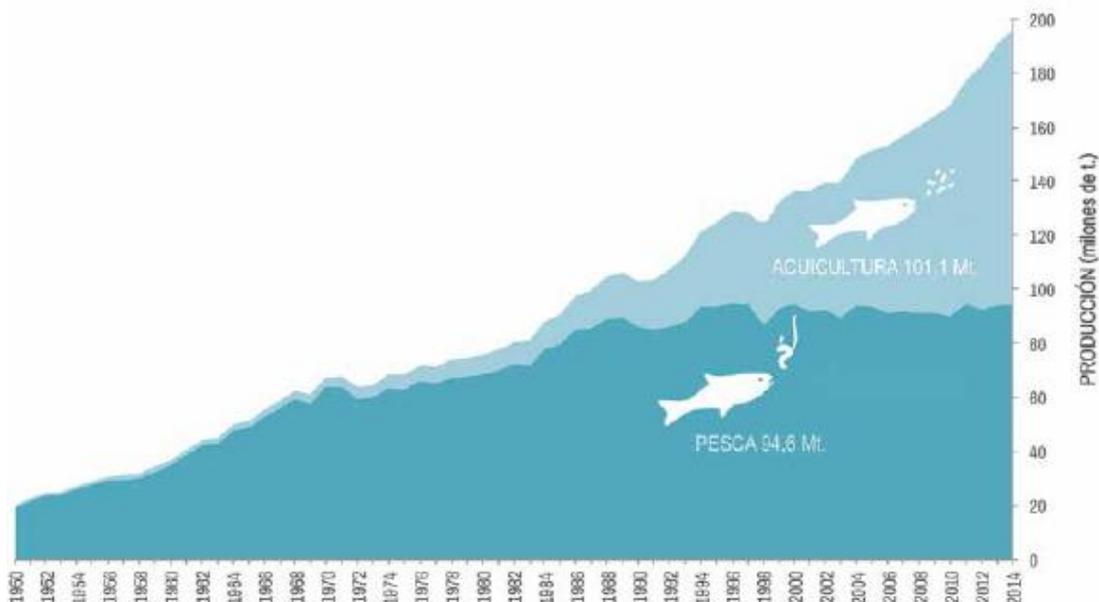


Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo de 1950-2014 (APROMAR, 2016)

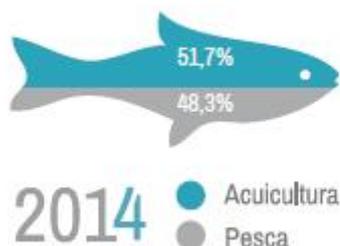


Figura 2. Producción en 2014 de productos acuáticos a través de la pesca y acuicultura (APROMAR, 2016).

El desarrollo de la acuicultura se está produciendo sobre todo en países en vías de desarrollo. China es el primer país productor mundial con 58,8 millones de toneladas (Tabla 1), este liderazgo se debe a la elevada población de este país y al alto consumo de productos acuáticos debido a su cultura.

Entre el resto de principales países productores destaca, en 2014, Indonesia con un fuerte crecimiento del 8,1%. Le siguen India y Vietnam con unas producciones de 4,9 millones de toneladas y 3,4 millones de toneladas, respectivamente. España ocupa la posición 22ª con 0,28 millones de toneladas y un crecimiento del 26,2%.

Tabla 1. Principales países productores de acuicultura por toneladas anuales en 2014 y tasa de variación interanual (APROMAR, 2016).

Pais	Cantidad (t)	% var. anual
China	58.797.258	2,9%
Indonesia	14.375.282	8,1%
India	4.884.021	7,2%
Vietnam	3.411.391	5,9%
Filipinas	2.337.605	-1,5%
Bangladesh	1.956.925	5,2%
Corea del Sur	1.567.442	2,2%
Noruega	1.332.497	6,8%
Chile	1.227.359	17,4%
Egipto	1.137.091	3,6%
TOTAL 10 PRAES. PRODUCTORES	91.026.871	4,2%
RESTO DE LOS PAISES	10.112.201	3,0%
TOTAL MUNDIAL	101.139.072	4,1%
España	282.242	26,2%

España es el estado miembro de la Unión Europea con más volumen de producción en acuicultura, con 282.242 t en 2014 (22% del total de la Unión Europea), seguido por Reino Unido con 204.617 t (15,9%) y Francia con 204.300 t (15,9%). Sin embargo, cuando se considera el valor económico, el Reino Unido es el principal Estado miembro con 1.016,3 millones de euros (23,8 % del valor total), seguido por Francia con 774,2 millones de euros (18,8 %) y Grecia con 472,9 millones de euros (11,6 %). España ocupa la cuarta posición, con 450,1 millones (10,2%), seguida de Italia (Figura 3).

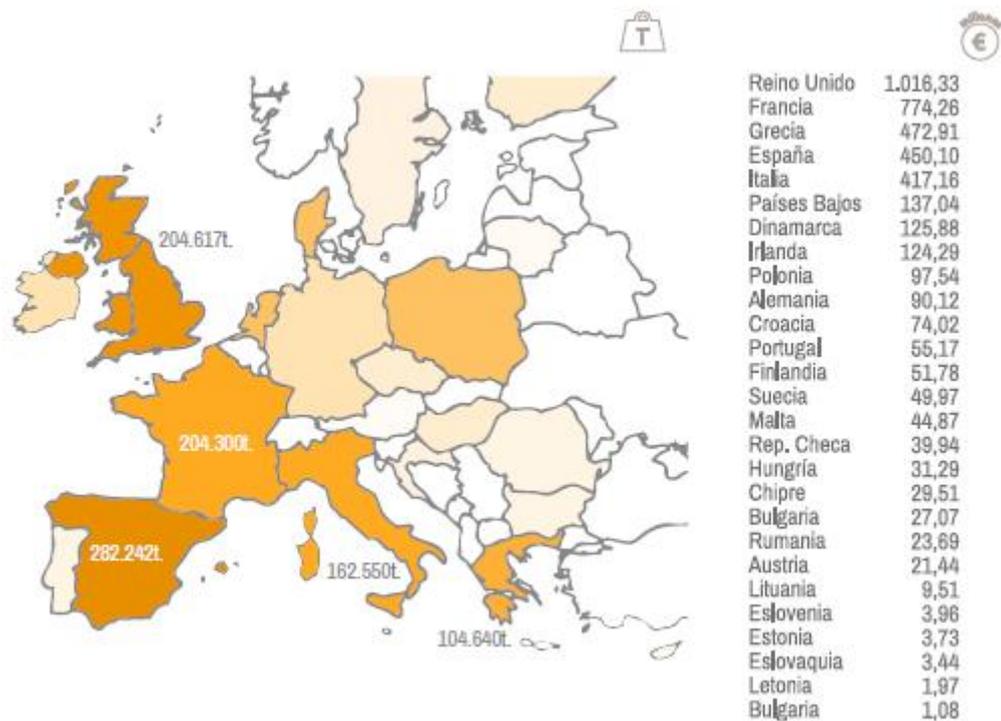


Figura 3. Distribución de la producción de acuicultura en los estados miembros de la Unión Europea por su cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2014 (APROMAR, 2016).

La principal especie producida en España en 2014 fue el mejillón (220.449 t), seguido por la lubina (17.376 t), la dorada (16.230 t) y la trucha arco iris (15.111 t) (Figura 4).

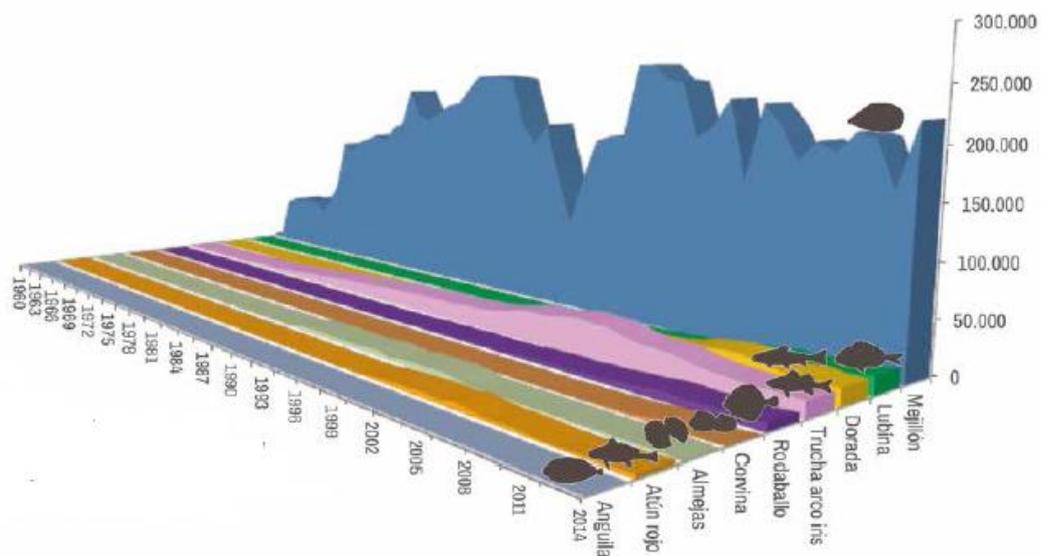


Figura 4. Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas y por especies, en el periodo 1960-2014 (APROMAR, 2016).

1.2. PRODUCCIÓN DE LA DORADA

Existe producción de dorada de acuicultura en 20 países, siendo los principales productores Grecia, con 65.000 t (que representa el 35,8 % de la producción total), Turquía con 48.000 toneladas (26,5 %), Egipto con 17.000 t (9,4 %) y España con 16.231 t (8,9 %)(ARPROMAR, 2016).

La producción de dorada de acuicultura en España en 2015 ha sido de 16.231 toneladas, prácticamente idéntica a la de 2014. La máxima producción anual española de dorada tuvo lugar en 2008, con 23.930 t (Figura 5).

En 2015, la Comunidad Valenciana encabezó la producción de dorada en España con 7.397 t (el 45,6 % del total), seguida por Murcia (4.103 t, el 25,3 %), Andalucía (2.333 t, el 14,4 %), Canarias (1.884 t, el 11,6 %) y Cataluña (514 t, el 3,2 %).

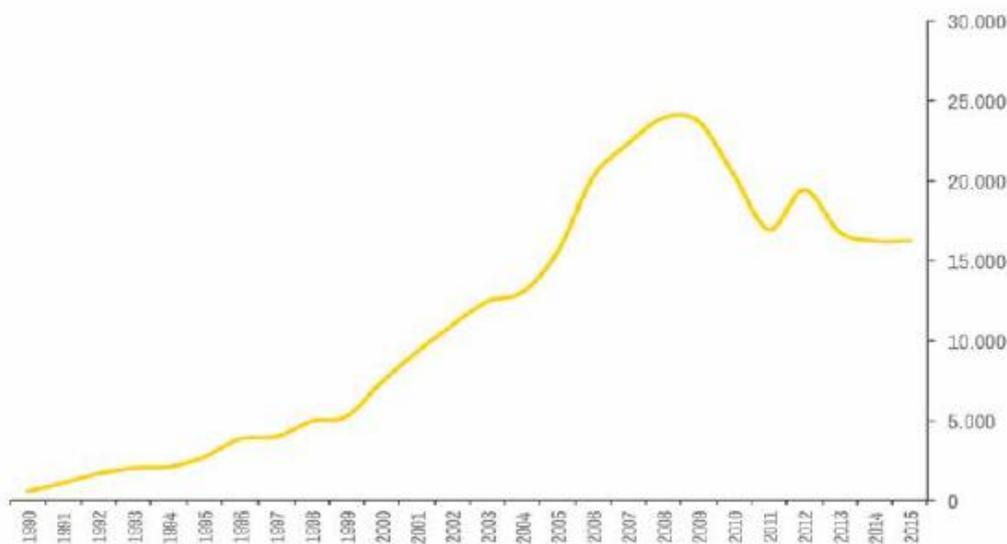


Figura 5. Evolución de la producción acuícola de dorada (*Sparus aurata*) en España (1990-2015), (APROMAR, 2016).

1.3. PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LAS HARINAS DE PESCADO

En general, los peces necesitan un elevado nivel de proteína del orden de 350 a 550 g/kg de pienso (Jover et al. 2002). Son unos valores altos ya que la mayoría de las especies son carnívoras y sus sistemas enzimáticos están adaptados para la digestión de proteínas. El nivel óptimo de proteína en el pienso de la dorada (*Sparus aurata*) es del 42%, aunque depende del tamaño de la misma (Moyano y Alarcón, 1997). La dorada es un pez carnívoro y por ello su fisiología digestiva está adaptada al consumo de pescado.

La harina de pescado se obtiene de peces de bajo valor comercial, ya sea por el tamaño o por su escasa abundancia, como por ejemplo las sardinas y los arenques. Para producir una tonelada de harina de pescado hacen falta aproximadamente 4 toneladas de pescado fresco (Beveridge, 2001; Scottish Executive, 2002). El aumento de la producción acuícola ha conllevado a una mayor demanda de la harina de pescado, por lo tanto, a una mayor presión pesquera de los caladeros.

Las harinas de pescado constituyen una fuente de proteína bien adaptada a los peces ya que son ricas en aminoácidos esenciales, con un perfil que se corresponde a los requerimientos de los peces. Los aceites incluidos en la harina de pescado son una excelente fuente de energía y tienen un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, y los ácidos grasos esenciales que requieren los peces. También contienen minerales esenciales (calcio, fósforo, magnesio y oligoelementos) y vitaminas (B12, A, D3, colina, inositol, etc.) (Guillaume et al. 2002).

Estas características explican el predominio de la utilización de la harina de pescado en la acuicultura. No obstante, estos productos son limitados y caros, ya que debido al aumento de la producción acuícola se han elevado los precios de estas harinas y se ha producido una disminución de la disponibilidad de este alimento.

Por esta razón, es necesario estudiar otras fuentes alternativas de alimentación para la formulación de piensos, que tengan precios más asequibles y una disponibilidad mayor, considerando, además, que la alimentación de las especies carnívoras supone de un 39 a un 49% de los costes de producción de una granja marina (Merinero et al. 2005).

El desarrollo de piensos para la acuicultura ha demostrado un progreso continuo en las últimas décadas con piensos diseñados específicamente para satisfacer las necesidades nutricionales de las especies, la etapa del ciclo de vida y el estado de salud de los peces. Es ampliamente aceptado que la nutrición tiene importantes implicaciones para la salud en los peces y, por tanto, es sumamente importante que se formulen los piensos correctamente, ya que como se ha comentado anteriormente, representan el mayor gasto para la industria y por lo tanto deben integrarse plenamente en las estrategias de gestión sanitaria para acuicultura.

1.4. FUENTES PROTEICAS ALTERNATIVAS

Actualmente, diferentes equipos de investigación a nivel nacional e internacional, concentran sus esfuerzos en la selección de ingredientes proteicos alternativos, tanto de origen animal como vegetal con los que sustituir parcialmente la cantidad de harina de pescado a incluir en los alimentos para peces. Ello permitiría no solo la posibilidad de abaratar costes, sino lo que quizás es más importante, aseguraría el suministro a los productores acuícolas de piensos de calidad elevada y relativamente estable, no dependientes de los problemas de suministro, calidad y fluctuación de precios de harina de pescado (Robaina, 1998).

Entre las distintas harinas alternativas que se utilizan para sustituir a las harinas de pescado, las más utilizadas son harinas de origen vegetal (semillas, hojas y derivados) y harinas de origen animal (plumas, huesos y carne).

Uno de los problemas de las fuentes proteicas alternativas es que disminuye su digestibilidad, frente a la harina de pescado. Los valores más altos de digestibilidad se encuentran para aquellas materias primas de alto contenido en proteína (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes de digestibilidad aparente (%) de la proteína de distintas materias primas animales y vegetales en la dorada (Moyano y Alarcón, 1997).

Digestibilidad proteica para la dorada (<i>Sparus aurata</i>) (%)	
H. Pescado	90-97
H. Sangre	40-53
H. Carne	90
Subproductos avícolas	80-40
H. Soja	86-93

1.4.1. Harinas de origen vegetal

Las materias primas de origen vegetal son muy numerosas. Tienen un precio de mercado menor y más estable que las harinas de origen marino. Tienen poder aglutinante, son ricas en vitaminas del grupo B. Sin embargo, la gran mayoría no cubre las necesidades de los peces (aminoácidos y ácidos grasos esenciales), son menos apetecibles y el almidón, su principal fuente energética, no siempre es bien digerido por éstos, sobre todo si son carnívoros.

Las tortas son productos de la extracción de grasas, menos ricos en proteínas que las materias primas animales (30 al 50% de proteínas), contienen menos cenizas pero en cambio albergan compuestos de membrana (pectinas, hemicelulosa, celulosa, lignina...), frecuentemente indigestibles. La torta de soja es la más utilizada debido a su disponibilidad en el mercado, su regularidad y su precio, es rica en proteínas (49% si está descascarillada y 44% si no lo está). El perfil de aminoácidos esenciales es bueno a pesar de ser deficientes en metionina (Guillaume et al. 2002).

A pesar de que las harinas vegetales presenten la ventaja de tener un menor coste económico y ser más estables en el mercado, se debe tener en cuenta que contienen una amplia variedad de sustancias antinutritivas. Estos factores antinutritivos son sustancias que bien por sí mismas o a través de productos metabólicos dificultan la digestión del alimento, afectando a la salud y producción animal (Makkar, 1993).

Las fuentes de proteínas vegetales contienen ciertos compuestos no digeribles y factores antinutricionales (inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas y alérgenos) que pueden afectar a la digestibilidad y absorción de los nutrientes, integridad intestinal, promoción de entrada de bacterias y por tanto, contribuir al desarrollo de enfermedades (Estruch et al. 2015).

Los compuestos con acción antinutricional, comunes en los productos vegetales y raros en los productos de origen animal, constituyen (Guillaume et al. 2002):

- Antinutrientes en sí mismos, que limitan la utilización de nutrientes específicos, como la inhibición de la actividad de la tripsina.
- Compuestos que limitan la eficacia de los procesos digestivos de una forma más o menos específica. Es el caso del ácido fítico.
- Compuestos que ejercen una acción a nivel metabólico, correspondiendo más a sustancias tóxicas que a factores antinutricionales propiamente dichos. Es el caso de los compuestos anti-tiroideos de las crucíferas.
- Sustancias con una forma de acción múltiple, incluyendo la supresión de la apetencia.

Por lo tanto, los factores antinutricionales de las harinas vegetales son una de las principales causas por las que se han empezado a emplear fuentes proteicas animales ya que cubren mejor las necesidades esenciales de los peces y presentan menos factores antinutricionales.

1.4.2. Harinas de origen animal

Las harinas de origen animal se fabrican a partir de desechos de matadero y carnicería, la calidad es muy variable, normalmente está limitada por el exceso de cenizas o minerales, llegando en los peores casos a contener un 35% de cenizas. En los mejores casos contienen entre un 45 y un 60% de proteínas con un valor biológico bueno. La temperatura de cocción, que siempre debe ser elevada por razones sanitarias, no permite obtener proteínas tan digestibles como las de las harinas de pescado. Los lípidos son del 8 al 10% y contienen sobre todo ácidos grasos saturados o monoinsaturados y una cantidad ínfima de ácidos grasos poliinsaturados. Otras harinas de origen animal utilizadas son las harinas de chicharrón, harinas de plumas hidrolizadas, harinas de desechos de aves y harinas de sangre (Guillaume et al. 2002).

En la actualidad hay una elevada cantidad de residuos de proteínas de origen animal que se crean todos los días, materias primas de restos de productos cárnicos. Por ello los alimentos que no son utilizados para el ser humano son procesados para obtener harinas de origen animal utilizadas para la alimentación de otros animales. Estos subproductos cárnicos son reciclados (rendering) siguiendo un tratamiento adecuado para la destrucción de población microbiana, extracción de la grasa de la proteína y eliminación de la humedad. Se ha calculado que aproximadamente en 2008 la producción mundial de harinas y grasas de proteína animal fundidas fue aproximadamente de 13,0 millones de toneladas y 10,2 millones de toneladas respectivamente (Calabuig, 2014).

Como consecuencia de la aparición de la encefalopatía esponjiforme (llamada comúnmente “enfermedad de las vacas locas”), se prohibió la utilización de vísceras de ruminantes o cadáveres tratados en mataderos para la elaboración de harinas de origen animal. La encefalopatía esponjiforme nunca se ha observado en los peces, por lo que

el riesgo de transmisión del agente patógeno se puede considerar nulo. Sin embargo, para tranquilizar a clientes y consumidores, algunas industrias fabrican alimentos garantizados libres de carne (Guillaume et al. 2002).

Actualmente, según el Reglamento (UE) nº56/2013 de la Comisión de 16 de enero de 2013, se permite el uso de todas las harinas de origen animal excepto harinas de rumiantes.

Hay diferentes estudios en los que se evalúa la sustitución de la harina de pescado por harinas animales en dorada, como el caso de Martínez-Llorens et al. 2008, donde se observó que añadiendo un 5% de harina de sangre (sustituía un 15% de harina de pescado) no hubo efectos en los parámetros de crecimiento. En experimentos posteriores también se ha observado, que una sustitución del 50% de harina de pescado por harina de carne y huesos tampoco tenía efectos negativos en el crecimiento (Nengas et al. 1999; Calabuig, 2014; Moutinho et al. 2016).

1.4.3. Otros aditivos para mejorar los resultados de los piensos con bajo contenido en harina de pescado: piensos funcionales

“Pensos funcionales” se emplea para describir los piensos a los que ha añadido beneficios por encima de los requerimientos nutricionales básicos y se espera que éstos mejoren tanto el estado de salud, la digestibilidad y por lo tanto, el crecimiento de los peces. Esto permite un cambio en los tratamientos quimioterapéuticos y antibióticos. Un gran número de aditivos comerciales para piensos están disponibles para su inclusión en los piensos funcionales que pueden ser ampliamente desglosados en prebióticos, probióticos, inmunoestimulantes, vitaminas, nucleótidos, minerales y extractos de plantas o microalgas. La inclusión de éstos tiene el principal objetivo de alterar la microbiota intestinal y mejorar las bacterias que dan como resultado un rendimiento deseable, mientras que al mismo tiempo pueden reducir las bacterias patógenas o dañinas para el organismo.

A su vez, la microbiota intestinal impacta tanto la digestión como la salud, ya que el revestimiento intestinal y el tejido linfóide asociado al intestino son la interfaz directa entre el intestino. Los probióticos pueden definirse como microorganismos que promueven el estado general de salud de un organismo. En el contexto de esta revisión se definen más estrechamente como especies bacterianas que mejoran la salud y el rendimiento del intestino con beneficios secundarios de salud animal.

En el caso de los aditivos, está claro que hay efectos beneficiosos:

-La exclusión competitiva de bacterias patógenas (Garriques y Arevalo, 1995; Moriarty, 1997; Balcázar et al. 2004; Vine et al. 2004);

-Fuente de nutrientes y contribución enzimática a la digestión (Sakata, 1990; Prieur et al. 1990; Garriques y Arevalo, 1995);

-Absorción directa de material orgánico disuelto mediada por la bacteria (Garriques y Arevalo, 1995; Moriarty, 1997);

-Y otros todavía están siendo investigados como: el aumento de la respuesta inmune contra microorganismos patógenos (Andlid et al. 1995; Scholz et al. 1999; Balcázar et al. 2004); y efectos antivirales (Kamei et al. 1988; Girones et al. 1989; Direkbusarakom et al. 1998).

No obstante, no hay estudio del efecto de mejora de inclusión de aditivos en doradas alimentadas con harinas animales y vegetales.

1.5. FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS DIGESTIVAS

En el proceso de digestión, la proteína del alimento es hidrolizada por las enzimas digestivas (García-Carreño et al. 1997), las cuales catalizan la reacción de hidrólisis incrementando la velocidad de la reacción. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas.

Existen tres tipos de enzimas digestivas en los peces (Guillaume et al. 2002):

-Enzimas secretadas por el páncreas y, de forma minoritaria, por el estómago, en forma de gránulos de zimógeno o proenzimas inactivas. Estas proenzimas, que nunca tienen un origen bucal en los peces, se activan en el estómago y sobretodo en el duodeno.

-Enzimas de membrana que se encuentran en pequeñas proporciones en el quimo, pero que sólo actúan, en condiciones normales, ligadas a la membrana de las microvellosidades. Todas estas enzimas son intestinales y tienen la función de la degradación de los fragmentos de macromoléculas filtradas por el gicocálix.

-Enzimas del tubo digestivo localizadas fuera de la pared, por ejemplo, los lisosomas. Puede ser difícil determinar si estas enzimas participan en la digestión extracelular ya que su actividad se detecta *in vitro* después de la lisis de las células.

En 1964 la Comisión de Enzimas (E.C.) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) organizó los nombres de las enzimas y las clasificó en seis clases o categorías: óxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Las hidrolasas son las enzimas que catalizan reacciones de ruptura hidrolítica, la mayoría de enzimas digestivas se engloban dentro de las hidrolasas.

Dentro de las hidrolasas encontramos las proteasas que están representadas por una enzima gástrica, la pepsina y cuatro enzimas pancreáticas: tripsina, quimotripsina, colagenasa y elastasa. Son complementarias en su acción, de modo que cada una es activa sobre enlaces peptídicos bien definidos y diferentes (Tabla 3).

Tabla 3. Sitios de acción de las principales enzimas proteolíticas de los peces (Guillaume et al. 2002).

Enzima	Enlace hidrolizado
Pepsina	NH ₂ de los aminoácidos aromáticos y los diácidos
Tripsina	COOH de la arginina y de la lisina
Quimotripsina	COOH de los aminoácidos aromáticos
Elastasa	Aminoácidos alifáticos (especialmente activo sobre la elastina)
Carboxipeptidasas	Aminoácidos con COOH libre
Aminopeptidasas	Aminoácidos con NH ₂ libre

La pepsina es la enzima que actúa en el estómago. Es liberada por las paredes del estómago en forma de pepsinógeno, que al exponerse con el ácido clorhídrico se despliega y se descompone en pepsina. La pepsina descompone las proteínas en polipéptidos y aminoácidos. Su actividad máxima se da a un pH ácido en torno a 2, en el cual prácticamente todo el pepsinógeno secretado está en forma de pepsina.

En la sección intestinal actúan las proteasas alcalinas, las más estudiadas dentro de este grupo son la tripsina y quimotripsina (son las principales enzimas que actúan en la digestión de las proteínas en el intestino). Estas enzimas son producidas en el páncreas y actúan en la digestión de las proteínas en el intestino, hidrolizan enlaces peptídicos de los aminoácidos. Como se observa en la Tabla 3, la tripsina hidroliza enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene arginina o lisina y la quimotripsina hidroliza enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano (Whitaker, 1994).

También dentro de las hidrolasas se encuentran las glucosidasas, la principal glucosidasa es la amilasa, que son las responsables de catalizar la hidrólisis del almidón y el glucógeno. En el reino animal se encuentra la α -amilasa que es producida en las glándulas salivares y en el páncreas, actúa a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado liberando moléculas de glucosa y maltosa, rompiendo enlaces α -(1,4) glicosídicos. Esta enzima se ha encontrado en todos los peces, incluso en los carnívoros de alta mar, que nunca obtienen almidón en su dieta natural (Guillaume et al. 2002).

La fosfatasa alcalina (ALP) también es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Como sugiere su nombre, la fosfatasa alcalina es más efectiva en un entorno alcalino. El proceso de eliminar el grupo fosfático se denomina desfosforilación, esta enzima cataliza la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico (Álvarez, 2003).

Por otro lado, se encuentran las aminopeptidasas que actúan sobre el residuo amino de péptidos, no son enzimas secretadas de forma inactiva en los gránulos de zimógeno, son secretadas de forma activa (Guillaume et al. 2002). En este grupo se encuentra la leucina

aminopeptidasa (LAP), cataliza la hidrólisis de los péptidos que contienen leucina. (SPINREACT, 2013).

La digestión y la absorción de los nutrientes depende de la actividad de las enzimas digestivas, en particular las localizadas en la sección del borde del cepillo del intestino, responsables de las etapas finales de descomposición y asimilación de los alimentos (Klein et al. 1998). En los salmónidos, los niveles de inclusión más altos de fuentes proteicas vegetales llevaron a una marcada reducción en las actividades de tales enzimas en los enterocitos del intestino distal (Krogdahl et al. 1995, Bakke-McKellep et al. 2000). Esto sugiere que la medición de las actividades de estas enzimas puede representar una herramienta sensible para estudiar los efectos de las fuentes proteicas alternativas sobre la biodisponibilidad de nutrientes y para determinar la tolerabilidad a ciertos factores antinutritivos en diversas especies de peces.

1.6. FACTORES QUE AFECTAN A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de las enzimas digestivas puede variar con la edad del pez, el estado fisiológico y la estación. En muchos peces mientras mayor es la temperatura mayor es la secreción y la actividad enzimática. Uno de los aspectos que reviste de mayor importancia práctica en el estudio de la fisiología digestiva es el determinar qué factores y en qué medida pueden afectar a la óptima actividad de los enzimas digestivos de los peces en producción (Moyano, 2006). Los factores que afectan a la actividad enzimática son la temperatura, el pH, la concentración del sustrato y la presencia de inhibidores.

Al aumentar la temperatura se aumenta la actividad enzimática, siempre y cuando no se sobrepase el límite funcional de la enzima ya que la enzima sería desnaturalizada. El óptimo de temperatura para una enzima será aquel en el que se alcance su mayor actividad durante un largo periodo de tiempo sin que esta se desnaturalice. (Figura 6). La temperatura óptima de actividad de casi todas las enzimas de los peces se sitúa entre 30 y 40° (Guillaume et al. 2002). La temperatura a la que se desarrolla la actividad de los organismos acuáticos tiene poco que ver con los óptimos determinados para la actividad de sus enzimas digestivas. En el caso de las proteasas se suele situar entre 50-60°, extremos bien alejados de las condiciones fisiológicas (Kitamizado y Tachino, 1960; Alarcón et al. 1998). No obstante, las curvas que representan la actividad de las enzimas en función de la temperatura no siempre presentan los mismos perfiles y es precisamente a partir de tales curvas de donde se puede deducir qué porcentaje sobre la máxima actividad estaría presente a la temperatura real del entorno de la especie. (Moyano, 2006).

Cada enzima tiene un pH en el cual su actividad es máxima, si se encuentran en un medio donde el pH está fuera de su rango de actividad, se producirá una desnaturalización de dicha enzima. En medios muy ácidos o muy alcalinos, las enzimas se pueden desnaturalizar o quedar inactivas. Las condiciones físicas óptimas para la actividad de las diferentes enzimas se ilustran en la Figura 6. El pH óptimo para la pepsina se sitúa entre 2-3 y para el resto de enzimas entre 7-8 (Guillaume et al. 2002). En los peces que poseen estómago raras veces se consigue un pH óptimo (entre 2 y 3) para la actuación de la pepsina (Deguara et al. 2003; Yúfera et al. 2004). Esta circunstancia se ve agravada

por el hecho de emplear en los piensos ingredientes proteicos con una elevada capacidad tampón (por ejemplo, las harinas de origen animal) y la ingesta continua de agua salada que tiene lugar en los peces marinos (Moyano, 2006).

Por otro lado, al aumentar la concentración de sustrato de una muestra se aumentará la actividad enzimática hasta una concentración en la cual la enzima se satura debido a que todos los centros activos están ocupados. (BLOG DE BIOLOGÍA, 2017).

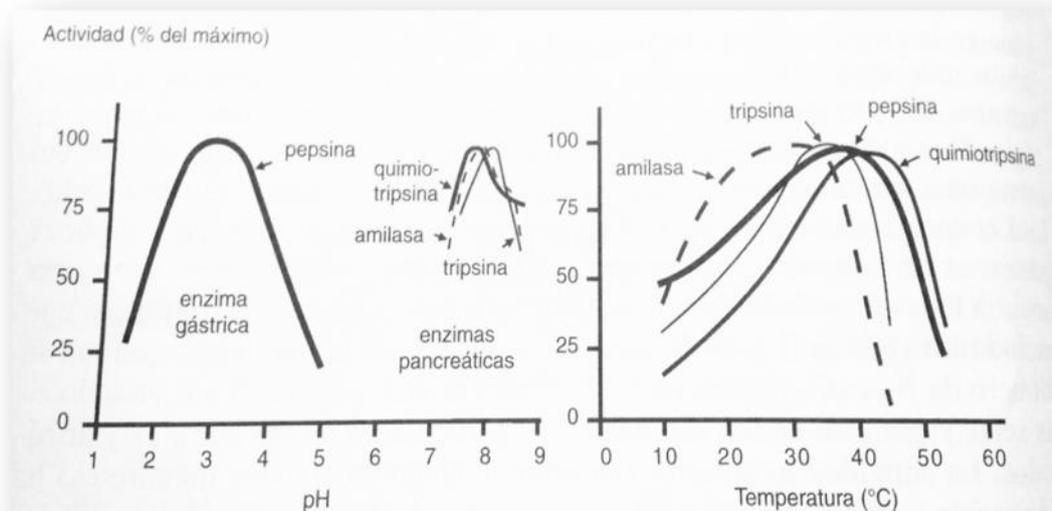


Figura 6. pH y temperaturas óptimas de las principales enzimas estomacales y pancreáticas en los peces (Guillaume et al. 2002)

Otro factor importante en la actividad enzimática es la presencia de inhibidores, que ralentizan o impiden la reacción enzimática. En la actualidad, con la necesidad de abaratar costes en los piensos, se intentan sustituir las harinas de pescado por otras como las harinas vegetales, las cuales en su mayoría contienen sustancias antinutritivas (Francis et al. 2001).

En una evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de proteasas alcalinas, de tres ingredientes vegetales (texturizado de soja, afrechillo de arroz y salvado de trigo) para pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), se concluyó que la actividad enzimática de proteasas alcalinas se veía inhibida con concentraciones moderadas de estas materias vegetales, llegando la inhibición a ser total en las concentraciones más elevadas (Pérez et al. 2003).

También Robaina (1998), utilizando como fuentes de proteínas alternativas a la harina de pescado la harina de soja y altramuz al 10, 20 y 30% en dorada, observó una reducción de la actividad de la tripsina en los peces alimentados con los piensos que incluían un 30% de harina de soja. También la actividad amilásica era más reducida en aquellos peces alimentados con los piensos que incluían la mayor cantidad de harina vegetal.

Según Silva et al. (2010), en un estudio sobre cómo afectan las harinas vegetales a la actividad enzimática en la dorada (*Sparus aurata*) y el carpín dorado (*Carassius auratus*), la sustitución de harinas de pescado por proteínas de origen vegetal tiene influencia sobre la actividad de las enzimas digestivas en la dorada aunque el crecimiento no se vio afectado, esto sugiere que los peces pueden adaptarse a una sustitución parcial de harina de pescado en el pienso. Cuando los peces eran alimentados con harinas vegetales la actividad de las enzimas fosfatasa alcalina y maltasa disminuyeron.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La dorada (*Sparus aurata*) es la especie más producida en el mediterráneo, sin embargo, en los últimos años, la rentabilidad de su producción se está viendo afectada debido por un lado a que el aumento de oferta ha disminuido el precio de venta, y por otro lado, porque la alimentación de los peces sigue representando el 50% de los costes de producción (Merinero et al. 2005).

Por lo tanto, una de las vías para mejorar la rentabilidad de la producción de la dorada es disminuir los costes de la alimentación. En este sentido, el reducir la incorporación de las materias primas más caras, como la harina y el aceite de pescado, puede ser la solución. No obstante, la sustitución de harina de pescado por fuentes proteicas vegetales en piensos comerciales se realiza actualmente en niveles del 80-90%. Por lo tanto, los piensos actuales para peces marinos contienen alrededor de un 10-20% de harina de pescado, el coste del pienso se ha reducido pero no ha habido una mejora en el crecimiento de los peces y lo peor es que ha habido un empeoramiento de los índices de conversión del alimento, debido posiblemente al alto contenido en materias primas vegetales que se utilizan en la actualidad.

Una de las razones de la baja conversión del alimento en piensos con altos porcentajes de fuentes proteicas vegetales son las deficiencias de algunos aminoácidos, junto al elevado porcentaje de componentes antinutritivos de éstas. La inclusión de otras fuentes proteicas en piensos, las fuentes proteicas animales, en combinación con las vegetales, puede limitar estos inconvenientes y además complementar las deficiencias de aminoácidos.

Por lo tanto, y debido a la importancia de la actividad enzimática sobre la digestión y disponibilidad de los nutrientes, en el presente trabajo se pretende estudiar el efecto de la sustitución de harina de pescado por una mezcla de harinas animales y vegetales (harina de carne de cerdo ibérico, harina de soja, de guisante y de girasol) en la actividad de las siguientes enzimas: pepsina, tripsina, α -amilasa, fosfatasa alcalina (ALP) y leucina aminopeptidasa (LAP).

Además, se evaluará el efecto de una microalga, *Isochrysis galbana*, en el pienso sin harina de pescado, sobre la actividad enzimática.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INSTALACIONES

La fase experimental del presente estudio se realizó en el Laboratorio de Acuicultura (LAC) del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València.

El laboratorio dispone de varias líneas de experimentación, integradas en un circuito cerrado de recirculación de agua que permite realizar diversos experimentos con especies tanto de agua dulce como de agua salada a distintas temperaturas.

Este trabajo se realizó en la línea 2 del LAC, perteneciente al circuito cerrado de agua marina que, tras una correcta depuración de la misma, permite su reutilización evitando un gasto excesivo de agua.

Esta línea consta de una red de canaletas que recogen el agua de los tanques y la llevan a un filtro rotatorio, donde se eliminan los sólidos. Después, el agua pasa a un aljibe general y, a continuación, a un biofiltro que elimina el exceso de amonio. De este biofiltro, el agua pasa a otro aljibe desde el cual es enviada a los tanques por medio de bombas de impulsión.

La instalación también cuenta con una bomba de calor/frío para mantener la temperatura del agua constante durante todo el año. El aporte de oxígeno se realiza mediante un sistema de aireación con bombas electrosoplantes, que toman el aire del exterior, lo filtran y lo introducen en los tanques mediante difusores de material poroso asegurando una distribución uniforme del aire en pequeñas burbujas.

En caso de un fallo del sistema de aireación, existe un sistema de emergencia con el que se inyecta oxígeno al agua.

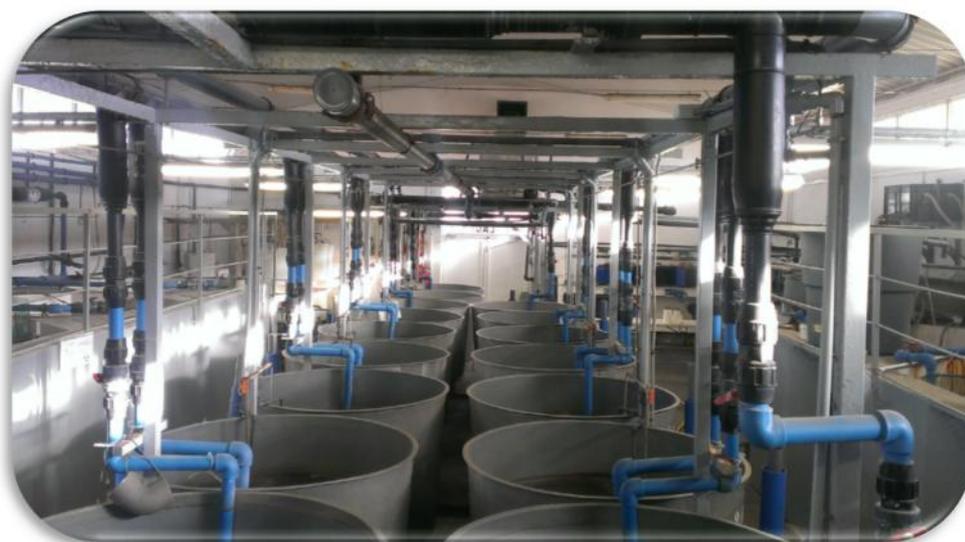


Figura 7. Distribución de los tanques de la línea 2 en el LAC. Fuente: Imagen del Grupo de Acuicultura y Biodiversidad de la UPV.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1. Obtención y manejo de los animales

Las doradas (*Sparus aurata*) fueron suministradas por la piscifactoría de Alevines del Mediterráneo, S.L. (Blaumar), Sagunto. Los peces fueron transportados al Laboratorio de acuicultura de la Universitat Politècnica de València.

Antes de la realización del experimento en la alimentación de los animales, fueron aclimatados a las condiciones de cría durante 4 semanas y fueron alimentados con un pienso estándar de dorada (48% proteína, 23% de lípidos, 11% de cenizas, 2,2% de fibra y un 14% de extracto libre de nitrógeno).

Después del periodo de aclimatación, los animales fueron pesados y distribuidos en 15 tanques de capacidad 1750 L, con un número de 24 peces/tanque. El peso medio de los animales al inicio de los tratamientos fue de 64g (Tabla 4).

La duración del ensayo fue de 114 días. El ensayo se realizó en un sistema de recirculación de agua marina (capacidad de 65 m³) con un filtro mecánico rotatorio y un biofiltro de gravedad (aproximadamente 6 m³). La temperatura del agua osciló entre 21 ± 0,82°C (media ± DE). La salinidad fue de 33 ± 2,15 g L⁻¹. El nivel de oxígeno disuelto fue de 7,1 ± 0,73 mg L⁻¹. El pH varió de 8 a 8,5 durante el ensayo. Todos los tanques estaban equipados con aireación. La temperatura del agua permaneció constante por una bomba específica de calor / frío instalada en el sistema. El fotoperiodo fue natural en ambos ensayos, y todos los tanques tuvieron condiciones de luz similares.

Todos los peces se pesaron en intervalos de 30 días. Antes del pesaje, los peces se anestesiaron con 30 mg L⁻¹ de aceite de clavo (Guinama®, Valencia, España) con un 87% de eugenol. Al final del ensayo de crecimiento, todos los peces fueron pesados individualmente. Tres peces de cada tanque al final del ensayo fueron sacrificados al azar por un baño letal de aceite de clavo (150 mg L⁻¹) con el fin de obtener muestras para los ensayo de actividad enzimática.

Tabla 4. Resumen de los datos iniciales del experimento.

Datos iniciales del experimento	
Peso inicial tratamiento (g)	64
Total individuos	360
Individuos por tanque	24
Sistema experimental	15 tanques de 1750 l, con sistema de recirculación de agua
Tipos de pienso	FM100, FM25, FM10, FM0 y FM0+
Alimentación	6 días por semana, 2 veces al día. Alimentación manual A SACIEDAD
Réplicas	3 tanques/tratamiento
Duración (días)	114

3.2.2. Pienso experimentales

Se formularon cuatro piensos con diferentes niveles de reemplazo de harina de pescado y se denominaron FM25, FM10, FM0 y FM0+. Se utilizó un pienso control (FM100), con harina de pescado como única fuente proteica y cuyos ingredientes fueron harina de pescado, trigo, aceites de pescado y de soja y una mezcla de vitaminas y minerales.

En los piensos FM25, FM10, FM0 y FM0+ se sustituyó la proteína de la harina de pescado en un 75, 90 y 100%, respectivamente, por una mezcla de proteínas animales y vegetales consistente en harina de cerdo ibérico, harina de soja, harina de guisante y harina de girasol. Además, la microalga *Isochrysis galbana* se incluyó a 50 g kg⁻¹ en el pienso de FM0+. Para evitar posibles deficiencias en aminoácidos esenciales, se añadió metionina utilizando la referencia de las necesidades de aminoácidos de *Sparus aurata* según Peres y Oliva-Teles (2009).

Los ingredientes y la composición química de los piensos experimentales se presentan en la Tabla 5. Los diferentes ingredientes se pesaron individualmente y se mezclaron para formar una mezcla homogénea y se fabricaron usando un proceso de extrusión-cocción con una extrusora semi-industrial de doble husillo (CLEXTRAL BC-45, St. Etienne, Francia) en las instalaciones de la UPV.

Las condiciones de procesamiento fueron las siguientes: una velocidad de husillo de 100 rpm, una temperatura de 110 °C y una presión de 4-5 MPa.

Los peces fueron alimentados a mano dos veces al día (09.00 y 16.00 horas) hasta la saciedad aparente de lunes a sábado. Los pellets se distribuyeron lentamente, permitiendo que todos los peces comieran. El consumo de alimento se registró diariamente.

Tabla 5. Formulación y composición de los piensos experimentales

	Piensos experimentales				
	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+
Ingredientes (g Kg⁻¹)					
Harina de pescado	590	150	60		
Harina de trigo	259	56	14		
Harina de soja		171	206	220	206
Harina de guisante		101	122	129	111
Harina de girasol		101	122	129	111
Harina de cerdo ibérico		237	288	328	328
Microalga <i>I. Galbana</i>					50
Aceite de soja	96	56	50	41	41
Aceite de pescado	45	85	90	100	100
Fosfato monocálcico		28	33	38	38
L-Metionina ¹		5	5	5	5
Mezcla de vitaminas y minerales ²	10	10	10	10	10
Composición analizada (% materia seca)					
Materia seca (%MS)	90,86	91,66	90,50	90,88	90,26
Proteína Bruta (% PB)	47,20	46,51	47,14	47,04	45,98
Grasa Bruta (% GB)	19,89	19,06	18,56	18,67	19,53
Cenizas (%)	11,11	8,36	7,66	8,91	8,91
Carbohidratos (% CHO) ³	21,8	26,07	26,64	25,38	25,58

¹L-Metionina: Dibaq-Diproteg.

²Mezcla de vitaminas y minerales (g kg⁻¹): Premix: 25; Colina, 10; DL - a - tocoferol, 5; Ácido ascórbico, 5; (PO⁴) 2Ca₃, 5. Composición de la premezcla: acetato de retinol, 1000000 UI kg⁻¹; Calciferol, 500 UI kg⁻¹; DL - a - tocoferol, 10; Menadiona sodio bisulfito, 0,8; Clorhidrato de tiamina, 2,3; Riboflavina, 2,3; Clorhidrato de piridoxina, 15; Cianocobalamina, 25; Nicotinamida, 15; Ácido pantoténico, 6; Ácido fólico, 0,65; Biotina, 0,07; ácido ascórbico, 75; Inositol, 15; Betaína, 100; Polipéptidos 12.

³Carbohidratos, CHO= 100 - (% PB +% GB+% cenizas).

3.3. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Para estudiar la eficiencia digestiva de los piensos, a través de la actividad enzimática, se realizará un análisis de tres peces por tanque, es decir, nueve peces por tratamiento de las siguientes enzimas digestivas: tripsina, pepsina, α -amilasa, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa.

Tanto la extracción de muestras como los análisis posteriores de actividad enzimática fueron realizados en el Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València.

Para la preparación de extractos enzimáticos se disponían las muestras de estómagos, ciegos pilóricos e intestinos en tubos de ensayos congelados a -20°C. Una vez descongeladas las muestras, se eliminaban de los tejidos los posibles fragmentos de grasa visceral, posteriormente se pesaban individualmente las muestras en una balanza analítica y se calculaba el volumen de agua milliQ para diluir las muestras (el volumen de agua que se utilizó fue una relación 1:3 de g mL⁻¹). Se separaron las muestras en distintos fragmentos para su introducción en tubos. En dichos tubos se introdujeron previamente dos bolas de metal para la posterior desintegración del tejido.

Una vez separada la muestra en varios fragmentos, cada una de ellas era desmenuzada utilizando tijeras, pinzas y bisturí para facilitar la posterior disgregación de la muestra. Una vez introducido en un mismo tubo el fragmento de muestra y agua milliQ, el conjunto de tubos se homogeneizaba en el aparato FastPrep®-24 ClassicInstrument, MP Biomedicals, United States (30 segundos, 6,5 m s⁻¹). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Por último, se transfirió el sobrenadante de todos los tubos con los fragmentos de una misma muestra a un mismo tubo falcon para ser homogenizados.

3.4. ANÁLISIS ENZIMAS

3.4.1. Análisis de pepsina

Para la determinación de la actividad enzimática de la pepsina se utilizó el método de Anson (1938). Se prepara el buffer y el sustrato conjuntamente, tampón glicina-HCl 100 mM pH 2,5 más hemoglobina (0,5% p/v) y por otro lado se prepara la solución de TCA (ácido tricloroacético) (20% p/v). Se adicionan 20 µL de la dilución del extracto y 1 mL de buffer-sustrato en tubos eppendorff. Se realizan cinco ensayos por muestra: 3 repeticiones con el extracto y 2 repeticiones control (en las repeticiones control no se añade la dilución del extracto). Se deja incubar 40 min a temperatura ambiente (25°C). Una vez pasan los 40 minutos se añaden 500 µL de TCA al 20% para detener la reacción y se adiciona a los tubos control los 20 µL de la dilución de extracto que no se habían añadido antes. Se mantienen durante 15 min las muestras en el congelador a -20°C y se centrifuga a 12000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, se realiza la lectura del sobrenadante en espectrofotómetro a 280 nm en cubeta de cuarzo y se obtiene la actividad de pepsina a través de las siguientes fórmulas:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta \text{absorbancia} * V_{\text{finalreacción}}}{CEM_{\text{tirosina}} * t_{\text{incubación}} * V_{\text{extracto}}} * \text{Factor de dilución}$$

$$\frac{U}{\text{tejido}} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{\text{tejido fresco}}{mL}}$$

3.4.2. Análisis tripsina

Para la determinación de la actividad enzimática de la tripsina se utilizó el método Erlanger et al. (1961). Para ello previamente se prepara el sustrato BAPNA en DMSO (50 mM) y el tampón Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 20 mM a pH 8,2. Posteriormente se diluye el sustrato BAPNA (50 mM) hasta la concentración 0,5 mM con el tampón Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 20 mM a pH 8,2. Por cada 10 µL de muestra, medidas por duplicado, se le añaden 200 µL de sustrato diluido BAPNA y la absorbancia del complejo coloreado formado es medido mediante un lector de placas (FLUOstar, BMG LABTECH, Alemania) a 405 nm cada 30 segundos en un periodo de 5 min. La actividad de la tripsina es medida a través de las siguientes fórmulas:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta \text{absorbancia} * V_{\text{finalreacción}}}{CEM_{\text{nitroanilida}} * t_{\text{incubación}} * V_{\text{extracto}}} * \text{Factor de dilución}$$

$$\frac{U}{\text{gtejido}} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{\text{gtejido fresco}}{mL}}$$

3.4.3. Análisis de α-amilasa

Para la determinación de la actividad enzimática de α-amilasa se utiliza el método de Robyt y Whelan (1968). En este caso el buffer-sustrato ya viene directamente preparado por la casa comercial Linear chemical S.L. (α-amilasa MR). Se adicionan 10 µL de la muestra y 200 µL de buffer-sustrato (se realizan dos réplicas por muestra) y la absorbancia es medida mediante un lector de placas (FLUOstar, BMG LABTECH, Alemania) a 405 nm cada 30 segundos (tras un minuto de incubación) en un periodo de 5 min y se obtiene la actividad de α-amilasa a través de las siguientes fórmulas:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta \text{absorbancia} * V_{\text{finalreacción}}}{CEM_{\text{CNP}} * t_{\text{incubación}} * V_{\text{extracto}}} * \text{Factor de dilución}$$

$$\frac{U}{\text{gtejido}} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{\text{gtejido fresco}}{mL}}$$

3.4.4. Análisis de la fosfatasa alcalina (ALP)

Para el análisis de la actividad de ALP se emplea un buffer y un sustrato proporcionados por la casa comercial SPINREACT, que consiste en una mezcla de dietanolamina y cloruro de magnesio a pH 10,4 y p-nitrofenilfofostato, respectivamente. El sustrato se diluye cinco veces en el tampón para constituir el reactivo de trabajo. A cada 10 µL de muestra, medida por duplicado, se le adicionan 200 µL y la absorbancia a 405 nm del complejo coloreado resultante se mide cada 30 segundos (tras un minuto de incubación) durante 5 minutos en un lector de placas (FLUOstar, BMG LABTECH, Alemania). La actividad de ALP se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta \text{absorbancia} * 3,3}{\text{tincubación}} * \text{Factor de dilución}$$
$$\frac{U}{\text{gtejido}} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{\text{gtejido fresco}}{mL}}$$

3.4.5. Análisis de la leucina aminopeptidasa (LAP)

Para el análisis de la actividad de LAP se emplea un buffer y un sustrato proporcionados por la casa comercial SPINREACT, que consiste en fosfatos a pH 7,2 y L-leucina-p-nitroanilida, respectivamente. El reactivo de trabajo consiste en la disolución del sustrato (en forma sólida) en ampollas de 3 mL de tampón. A cada 10 µL de muestra, medida por duplicado, se le adicionan 200 µL y la absorbancia a 405 nm del complejo coloreado resultante se mide cada 30 segundos (tras un minuto de incubación) durante 5 minutos en un lector de placas (FLUOstar, BMG LABTECH, Alemania). La actividad de LAP se obtiene a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta \text{absorbancia} * 1,544}{\text{tincubación}} * \text{Factor de dilución}$$
$$\frac{U}{\text{gtejido}} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{\text{gtejido fresco}}{mL}}$$

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

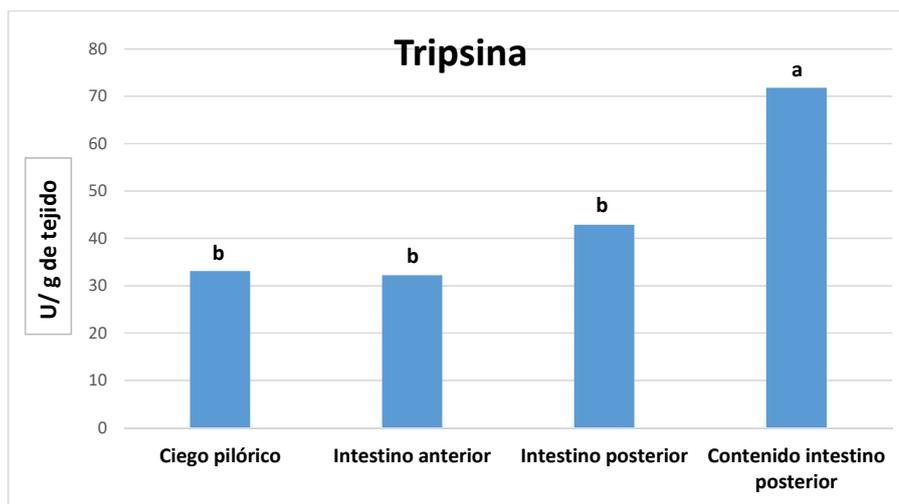
Los análisis estadísticos se han realizado con el programa StatgraphicsCenturion XVI® para Windows(r). Estos consistieron en el análisis de la varianza (ANOVAS de una vía para determinar diferencias significativas en actividad enzimática en función del pienso y de la región intestinal) y una ANOVA multifactorial usando como factores la región intestinal y el pienso para cada enzima. En ambos casos se utilizó la prueba de múltiples rangos basada en el método LSD de Fisher con un intervalo de confianza del 95%.

4. RESULTADOS

4.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR SECCIÓN

4.1.1. Tripsina

En la Figura 8 se muestran los resultados de la actividad de la tripsina en las diferentes muestras de tejido y contenido. Se observa que hay diferencias estadísticas significativas entre los tejidos y el contenido del intestino posterior. La mayor actividad de esta enzima se da en el contenido del intestino posterior.

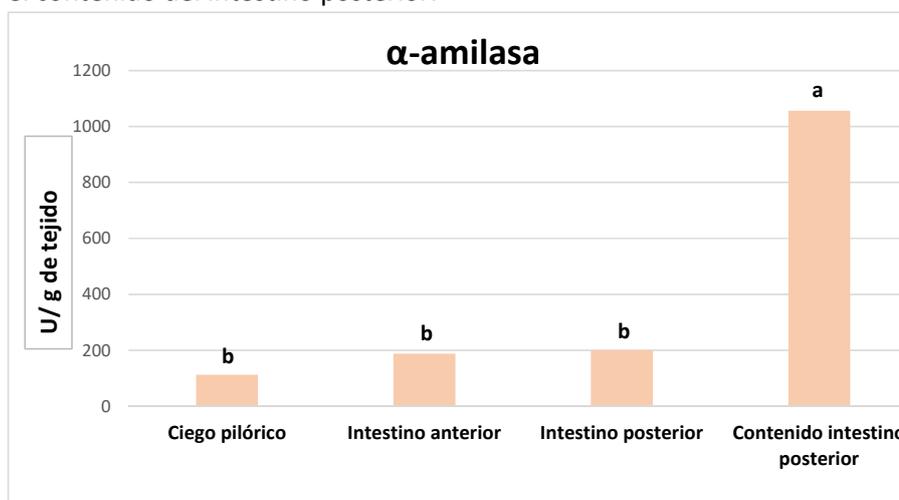


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=45 (n= número de observaciones del análisis por sección).

Figura 8. Actividad de la tripsina en las diferentes secciones intestinales.

4.1.2. α -amilasa

En la Figura 9, la actividad de α -amilasa es mayor en el contenido del intestino posterior. Hay diferencias estadísticas significativas entre la actividad de α -amilasa de los tejidos y el contenido del intestino posterior.

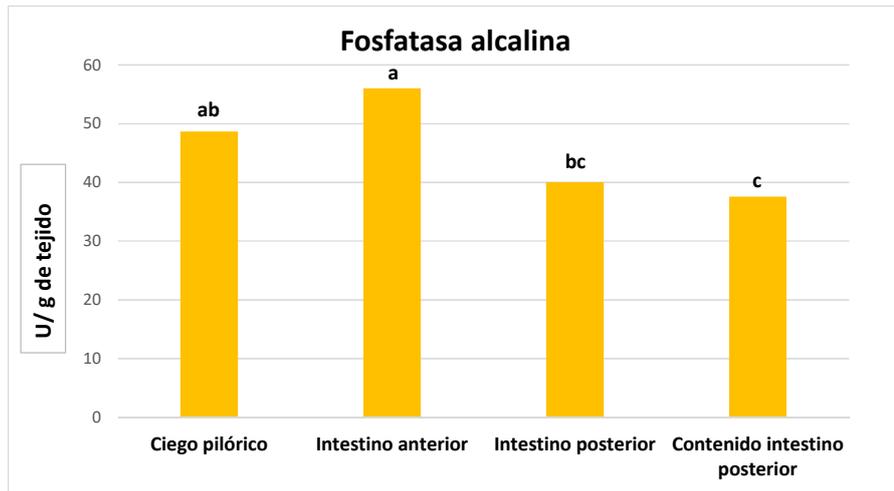


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=45 (n= número de observaciones del análisis por sección).

Figura 9. Actividad de la α -amilasa en las diferentes secciones intestinales.

4.1.3. Fosfatasa alcalina (ALP)

En la Figura 10 se observan diferencias estadísticas significativas entre el intestino anterior (donde se ha dado la mayor actividad de la fosfatasa alcalina) y el intestino posterior y el contenido del intestino posterior. También se encuentran diferencias estadísticas significativas de la actividad de la fosfatasa alcalina ALP, entre el ciego pilórico y el contenido del intestino posterior.

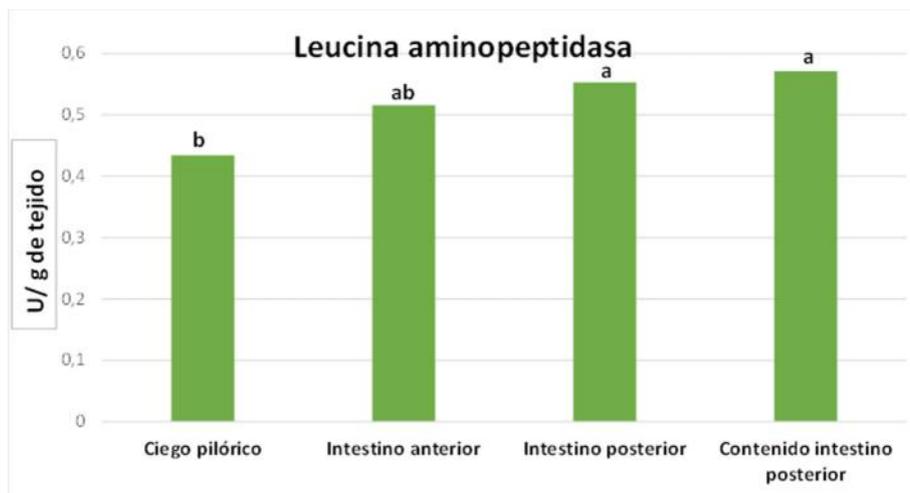


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=45 (n= número de observaciones del análisis por sección).

Figura 10. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en las diferentes secciones intestinales.

4.1.4. Leucina aminopeptidasa (LAP)

Se puede ver en la Figura 11 que la actividad enzimática de la leucina aminopeptidasa es menor en los ciegos pilóricos, incrementándose en la zona posterior, tanto en el tejido como en el contenido.



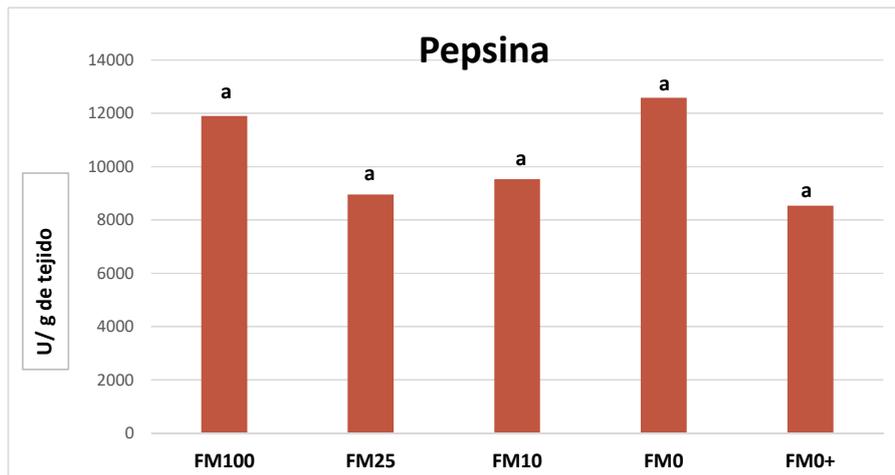
Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=45 (n= número de observaciones del análisis por sección).

Figura 11. Actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP) en las diferentes secciones intestinales.

4.2. EFECTO DEL PIENSO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.2.1. Pepsina

En la Figura 12 se muestra la actividad de la pepsina de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales. Se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos.

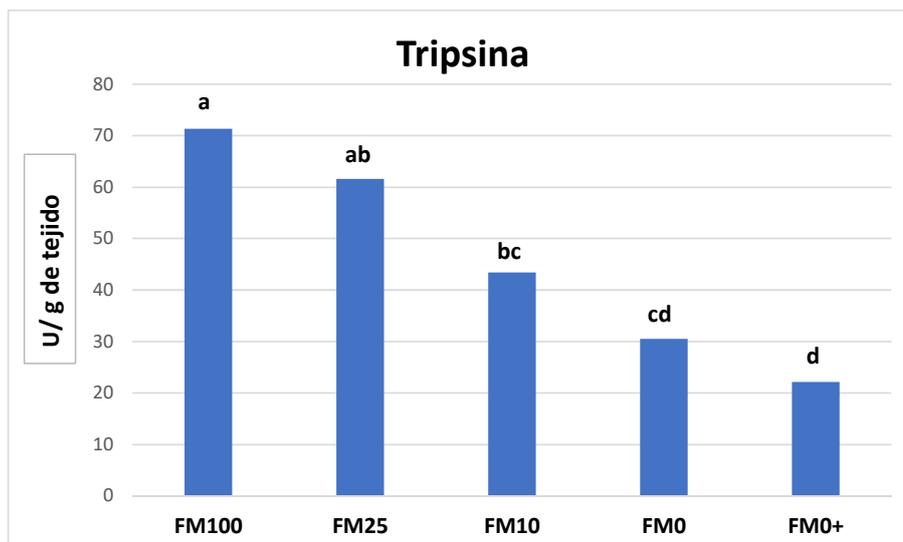


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=9 (estómagos observados por pienso).

Figura 12. Actividad de la pepsina según el pienso experimental suministrado.

4.2.2. Tripsina

En la Figura 13 se muestra una mayor actividad de la tripsina en las doradas alimentadas con los piensos sin o con menor sustitución de harina de pescado, siendo FM100 aquel en el que se ha dado una mayor actividad, sin diferencias con el pienso FM25. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas ni entre los piensos con una sustitución parcial de harina de pescado FM25 y FM10, ni entre los piensos de sustitución completa FM0 y FM0+ (con la adición de la microalga *Isochrysis galbana*).

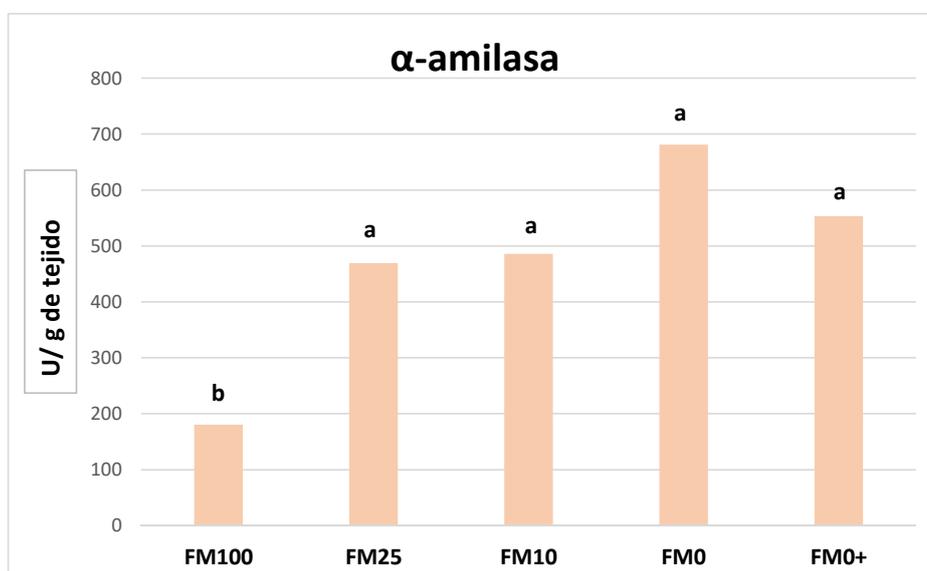


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=36 (n= número de observaciones del análisis por pienso).

Figura 13. Actividad de la tripsina según el pienso experimental suministrado

4.2.3. α -amilasa

Como se puede observar en la Figura 14, la actividad de la α -amilasa en las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales es mayor en los piensos con sustitución parcial y total de harina de pescado. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los piensos de sustitución parcial y completa FM25, FM10, FM0 y FM0+.

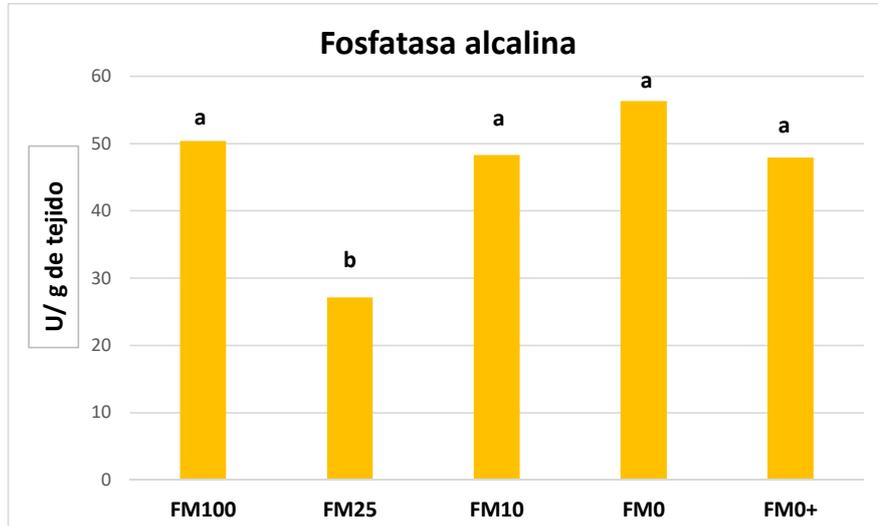


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=36 (n= número de observaciones del análisis por pienso).

Figura 14. Actividad de la α -amilasa según el pienso experimental suministrado.

4.2.4. Fosfatasa alcalina (ALP)

En la Figura 15 se muestra la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP) para las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales. Se encuentra una menor actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en el pienso FM25, entre los demás piensos no se hayan diferencias estadísticamente significativas.

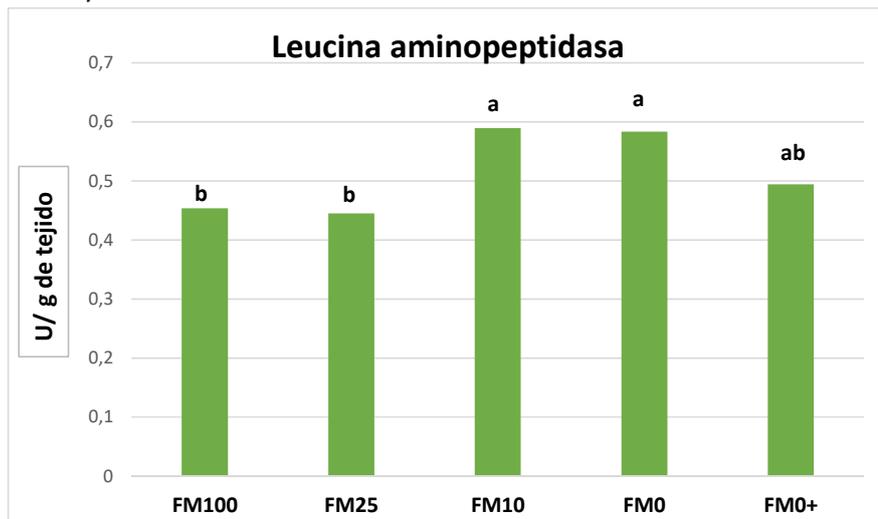


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=36 (n= número de observaciones del análisis por pienso).

Figura 15. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) según el pienso suministrado.

4.2.5. Leucina aminopeptidasa (LAP)

En la Figura 16 se observa que hay diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la leucina aminopeptidasa entre los piensos experimentales con los que han sido alimentadas las doradas. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el pienso control FM100 y los piensos FM25 y FM0+, pero sí con los piensos FM10 y FM0. Tampoco se encuentran diferencias significativas estadísticas entre los piensos FM10 y FM0.



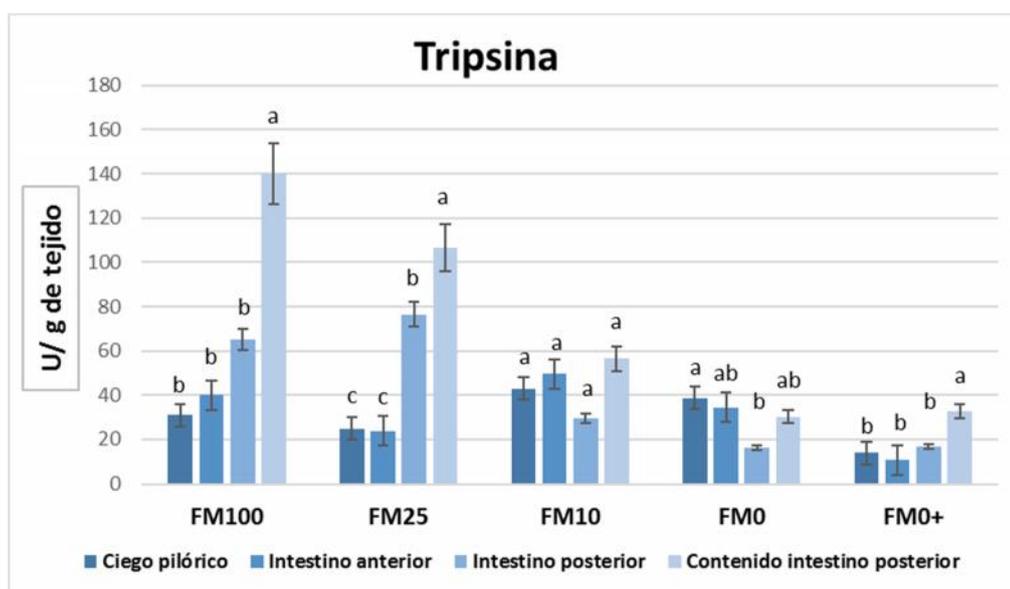
Las letras indican grupos homogéneos. Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=36 (n= número de observaciones del análisis pienso).

Figura 16. Actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP) según el pienso suministrado.

4.3. EFECTO DEL PIENSO Y LA SECCIÓN INTESTINAL SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.3.1. Tripsina

En la Figura 17 se observa la actividad de la tripsina en función del pienso experimental suministrado a las doradas y las diferentes secciones dónde se ha medido esta actividad. Se observa una actividad mayor de tripsina en general en los contenidos del intestino posterior respecto a los tejidos, habiendo en la mayoría de casos diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de tripsina del contenido posterior y de los demás tejidos excepto con el pienso FM10, donde no se observaron diferencias estadísticas entre las secciones de tejido. Los piensos con sustitución de harina de pescado presentan un menor valor de actividad de tripsina, siendo en el pienso control FM100 donde se han obtenido los mayores resultados de la actividad de esta enzima. A partir de un nivel de sustitución mayor del 75% se presenta una clara reducción de la actividad de tripsina, especialmente en el intestino posterior y contenido del intestino posterior. Los menores resultados se han obtenido en el pienso de sustitución completa FM0+ con la adición de la microalga *Isochrysis galbana*. En las dietas FM100 y FM 25 donde se ha observado una mayor actividad.

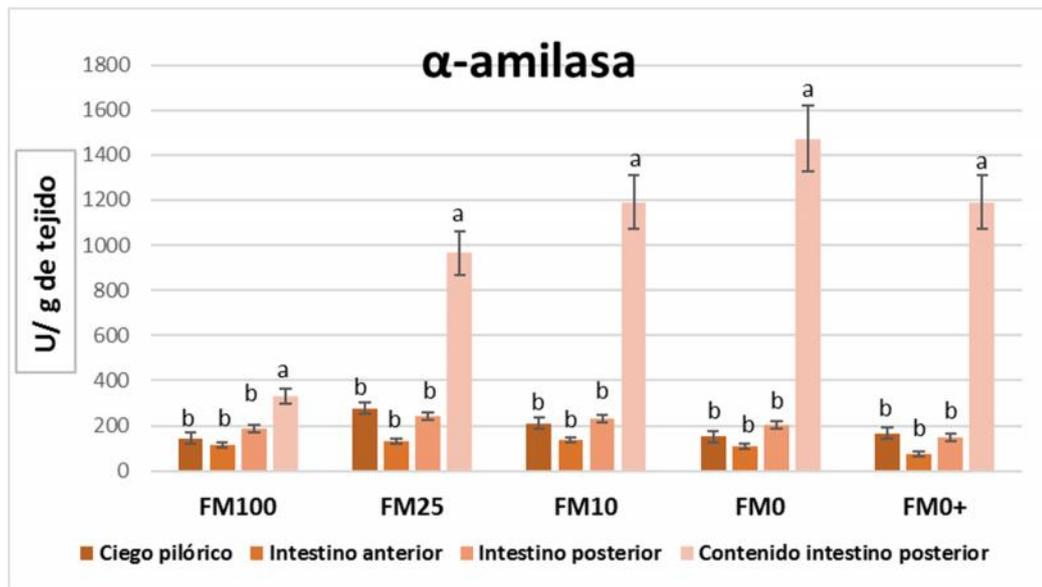


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=9 (n: número de observaciones del análisis por dieta).

Figura 17. Efecto del pienso y la sección en la actividad de la tripsina.

4.3.2. α -amilasa

En la Figura 18 se muestra la actividad de la α -amilasa en función del pienso suministrado a las doradas y la sección dónde ha sido medida la actividad de la enzima. Tal y como podemos observar, hay una clara diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de α -amilasa del contenido del intestino posterior y el resto de tejidos donde ha sido medida la actividad, observamos además una actividad más elevada en los contenidos del intestino posterior de los piensos con sustitución parcial y completa que en el contenido del intestino posterior del pienso control. También observamos que la actividad de esta enzima es mayor en los piensos con una mayor sustitución de harina de pescado.

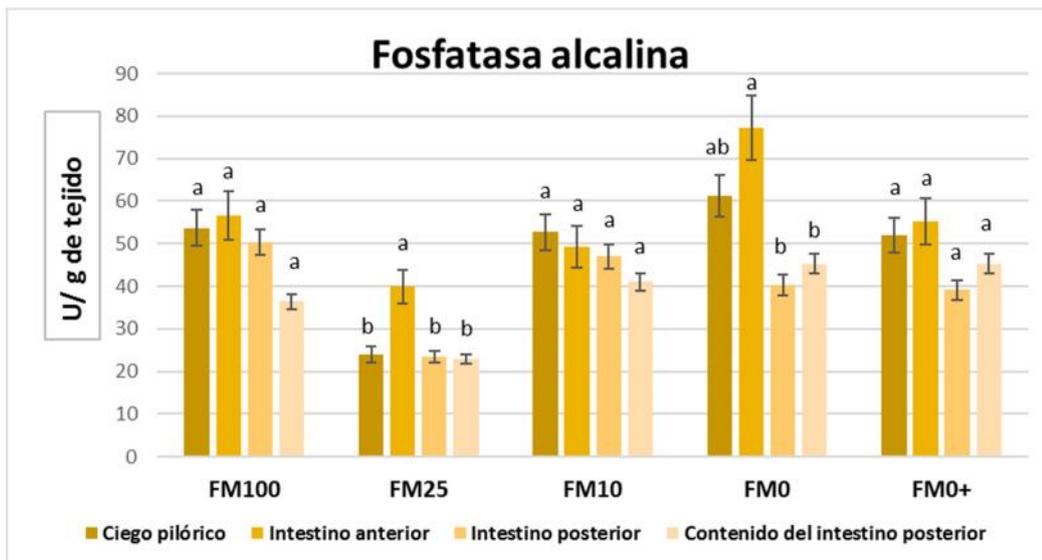


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=9 (n: número de observaciones del análisis por dieta).

Figura 18. Efecto del pienso y la sección en la actividad de la α -amilasa.

4.3.3. Fosfatasa alcalina (ALP)

En la Figura 19 se presenta la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) para todos los piensos experimentales con los que se ha alimentado a las doradas y las diferentes secciones donde se ha medido esta actividad. En la mayoría de los casos se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en las diferentes secciones donde se ha medido dicha actividad, excepto con el pienso FM0 donde hay diferencias estadísticamente significativas entre la actividad del intestino posterior y su contenido y los ciegos pilóricos y el intestino anterior. El FM25 es el pienso donde menores resultados se han obtenido de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), donde se observa una mayor actividad en el intestino anterior. El resto de piensos presenta una actividad de fosfatasa alcalina similar, siendo el pienso de sustitución completa FM0 en general superior.

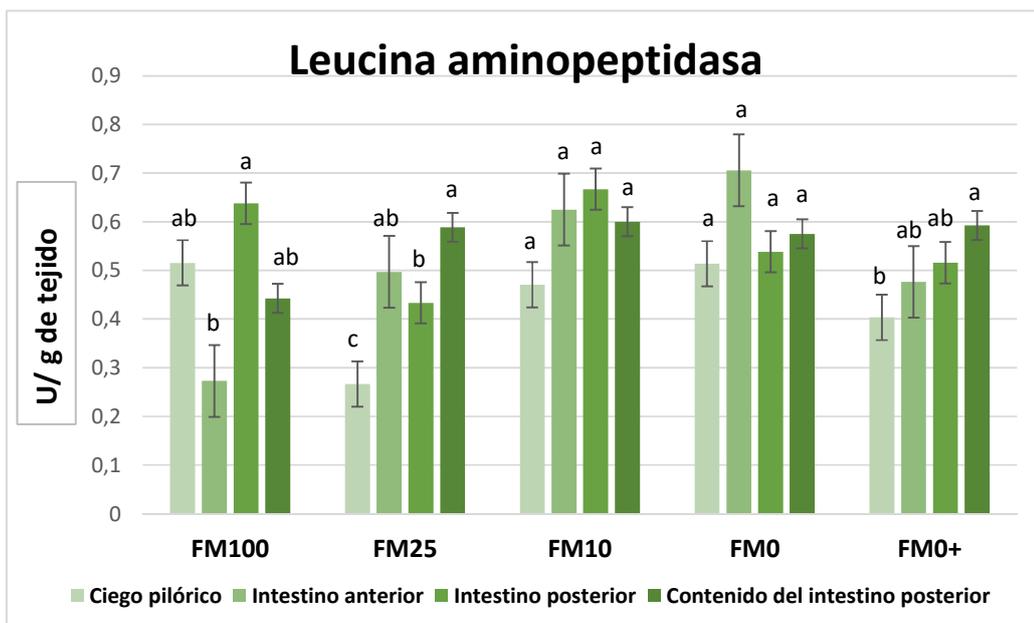


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=9 (n: número de observaciones del análisis por dieta).

Figura 19. Efecto del pienso y la sección en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)

4.3.4. Leucina aminopeptidasa (LAP)

En la Figura 20 se presentan los datos de la actividad de leucina aminopeptidasa (LAP) en función de los piensos experimentales con los que han sido alimentadas las doradas y las secciones donde ha sido medida esta actividad. Las mayores actividades de la enzima leucina aminopeptidasa (LAP) se observa en los piensos con una mayor sustitución de harina de pescado. La actividad se ve incrementada en la mayoría de los casos en la sección intestinal, se observa una actividad más reducida en los ciegos pilóricos excepto en el pienso FM100.



Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. Test LSD de Fisher, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%. n=9 (n: número de observaciones del análisis por dieta).

Figura 20. Efecto del pienso y la sección en la actividad de leucina aminopeptidasa (LAP).

5. DISCUSIÓN

En la actualidad se están buscando nuevas herramientas para mejorar el rendimiento de las granjas acuícolas y así afianzar de una manera más sólida el sector piscícola. Una de las mejoras es determinar la eficiencia digestiva de los piensos a través de la actividad enzimática ya que uno de los mayores costes de la producción acuícola es la alimentación.

Dado que la harina de pescado es una fuente proteica limitada y que las harinas vegetales tienen una alta disponibilidad en el mercado y a un precio razonable, debería considerarse el uso de fuentes de proteínas vegetales en los alimentos para peces. Sin embargo, los factores antinutritivos que contienen estas fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado producen diversos efectos negativos en los peces alimentados con piensos de proteínas vegetales (Francis et al. 2001). Estos incluyen una disminución en el rendimiento del crecimiento, la eficiencia de la alimentación (Sanz et al. 1994) y efectos sobre la actividad digestiva: como disminuir la actividad enzimática (Robaina et al. 1995), o formar complejos con minerales (Sugiura et al. 1999) y proteínas (Moyano et al. 1996), modificando así los procesos de digestión. Además, estos factores conducen a cambios histológicos en el intestino, lo que podría perjudicar la absorción intestinal.

Para evaluar los resultados obtenidos en cuanto a la actividad enzimática, hay que tener en cuenta los resultados obtenidos de crecimiento y parámetros nutritivos del presente trabajo. Como se puede ver en la Tabla 6, los peces alimentados con los piensos control y con menor sustitución de harina de pescado FM100 y FM25 presentan mayores pesos, siendo FM10 y FM0 los piensos con menor crecimiento. Además, se demostró que la inclusión en el pienso con sustitución total de la microalga *Isochrysis galbana* mejoraba el crecimiento, superando a los piensos FM0 y FM10. Sin embargo, la mejora del crecimiento de los peces alimentados con el suplemento del alga, no se ha producido por una mejora en la actividad enzimática de las proteasas, por lo que posiblemente esta mejora derive de otros efectos funcionales que aportan las microalgas y las cuales ya han sido observadas en algunos trabajos (Pulz y Gross, 2004).

Esto se respalda con los índices sobre eficiencia alimentaria obtenidos durante el ensayo de crecimiento, ya que ésta no se vio afectada por la sustitución de la harina de pescado. La tasa de alimentación diaria fue muy similar y sin diferencias significativas entre las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales, no pareciendo pues haber problemas de palatabilidad. Además, no hubo diferencias en cuando a índices de conversión del alimento ni eficiencia proteica, lo que viene a suponer que la digestibilidad de estos piensos fue similar. Es posible que la combinación entre fuentes proteicas vegetales y animales reduzca la cantidad de factores antinutritivos, ofreciendo una ventaja sobre las mezclas vegetales (Monge et al. 2016) en cuanto a eficiencia alimentaria.

Tabla 6. Resultados globales de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de las doradas alimentadas con los diferentes piensos experimentales durante los 114 días que duró el experimento (valores de medias \pm error estándar de la media).

	FM100	FM25	FM10	FM0	FM0+
Peso inicial	63,14	64,06	64,08	65,40	63,42
	$\pm 1,33$				
Peso final	217,8 ^a	208,2 ^a	163,7 ^b	134,9 ^c	177,8 ^b
	$\pm 8,6$	$\pm 11,1$	$\pm 8,3$	$\pm 8,5$	$\pm 8,5$
TAD³ (g 100 g pez⁻¹ día⁻¹)	1,64	1,45	1,51	1,44	1,50
	$\pm 0,05$	$\pm 0,07$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$

Superíndices con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas con una $p < 0,05$. Test de Newman-Keuls, $n=3$ (n: observaciones por dieta); TAD³ (g 100 g pez⁻¹ día⁻¹): Tasa de Alimentación Diaria = 100 x ingesta (g)/ biomasa media (g) x tiempo(días).

En cuanto a la actividad enzimática, en general, se muestra una mayor actividad en la parte final del sistema digestivo de la dorada por parte de todas las enzimas menos en la enzima fosfatasa alcalina ALP, en la cual se presenta una mayor actividad enzimática en intestinos anteriores y ciegos pilóricos. Esta mayor actividad en el intestino posterior y sobre todo en su contenido puede deberse a que en la mayoría de los peces muestreados, no se observó contenido de alimento en los ciegos pilóricos e intestino anterior, no siendo así en el caso del intestino posterior donde hemos encontrado contenido de alimento en muchas muestras. Posiblemente, esta presencia de alimento hace que la actividad enzimática en general sea mayor, y sobre todo en el alimento que es donde tienen que actuar para llevar a cabo la digestión.

Respecto a las enzimas estomacales, se analizó la actividad de la pepsina, no mostrando diferencias estadísticas significativas entre los diferentes piensos experimentales suministrados a las doradas, por lo que la sustitución de harina de pescado por harina de cerdo ibérico y harinas vegetales no ha supuesto cambios negativos en la actividad de la pepsina.

La actividad de la tripsina se vio más afectada por la sustitución de harina de pescado, probablemente debido a la presencia de inhibidores contenidos en de las harinas de origen vegetal, tal y como se observó en el estudio de dorada (*Sparus aurata*) de Robaina (1998) donde se observa una reducción de la actividad enzimática cuando hay una mayor inclusión de harinas vegetales en el pienso.

Sin embargo, poca atención se ha centrado en los efectos de la composición de los piensos sobre la actividad enzimática digestiva de los peces. Por ejemplo, Venou et al. (2003) observaron que la actividad de tripsina en la dorada disminuía cuando se incrementaba el contenido de gluten de maíz. En nuestro estudio, las doradas solo mostraron una disminución drástica de la tripsina en los contenidos intestinales y en el intestino posterior de los peces alimentados con altos niveles de harinas vegetales. En cambio, con el resto de tejidos no se observa una tendencia similar. El efecto sobre la inhibición de las enzimas por ingesta de leguminosas, parece ser que es más marcada en salmónidos¹ que en peces carnívoros marinos, al igual que en pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), (Pérez et al. 2003). Por ejemplo,

Krogdahl et al. (1994) concluyeron que la tripsina de trucha es altamente sensible a los inhibidores de proteasas vegetales.

La α -amilasa presentó una actividad enzimática mayor en las doradas alimentadas con piensos de mayor sustitución de harina de pescado por harinas de origen vegetal. Esto es como consecuencia de que las harinas de origen vegetal son una fuente de carbohidratos en general, y en concreto de almidón, cuyo contenido es mucho mayor que las harinas animales, por lo que la actividad de esta enzima se ve incrementada por su presencia. La mayor actividad en el contenido posterior o concuerda con los trabajos realizados por otros autores donde se observa que esta enzima es mucho más activa en las zonas intestinales posteriores (Krogdahl et al. 1994)

La enzima leucina aminopeptidasa (LAP) presenta una mayor actividad en los piensos con mayor sustitución de harina de pescado, lo cual puede ser debido a que la harina de carne de cerdo ibérico es rica en este aminoácido, lo cual podría haber estimulado una mayor actividad de esta enzima, ya que su función es romper la leucina terminal de las cadenas de polipéptidos.

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) no se ha visto afectada por una mayor o menor inclusión de harina de pescado. Aunque en el pienso FM25 se ha visto una disminución de la actividad de ALP, pero realmente no tiene una explicación muy clara, ya que se ajustó el nivel de calcio y fósforo en los piensos añadiendo fosfato cálcico a medida que se iba eliminando la harina de pescado. Por el contrario, en un estudio de Silva et al. (2010), se observó que disminuía la actividad de la fosfatasa alcalina en dorada al ser alimentadas con harinas de origen vegetal, posiblemente como consecuencia de la no adición de fosfato cálcico en los piensos sin harina de pescado.

6. CONCLUSIONES

Tras el estudio de la actividad enzimática en doradas alimentadas con piensos con diferentes sustituciones de la harina de pescado por una mezcla animal y vegetal, podemos concluir:

- La actividad de pepsina no se ve afectada por la sustitución parcial y total de la harina de pescado por la mezcla de harinas vegetales y harina de cerdo ibérico.
- La tripsina es la enzima más afectada por la inclusión de harinas de origen animal y vegetal en sustitución a la harina de pescado debido a la presencia de inhibidores contenidos en de las harinas de origen vegetal.
- La actividad de la α -amilasa se ve aumentada por la utilización de harinas vegetales en piensos de dorada debido al mayor contenido en carbohidratos, y en concreto de almidón en estas materias primas.
- La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) no se vio afectada por la sustitución de harina de pescado, gracias a la inclusión de fosfato cálcico en el pienso, a medida que aumentada la sustitución de este ingrediente.

7. BIBLIOGRAFÍA

A

ALARCÓN, F.J.; DÍAZ, M.; MOYANO, F.J.; ABELLAN, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream *Sparus aurata*, L. and common dentex *Dentex dentex*. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 257-267.

ALVAREZ, C.A. (2003). *Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis Doctoral de Grado de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

ANDLID, T.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.V.; GUSTAFSSON, L. (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.*, 30: 321–334.

ANSON, M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79–89.

APROMAR (2016). La acuicultura en España 2016. Asociación Empresarial de Acuicultura de España. 88pp.

B

BAKKE-MCKELP, A.M.; PRESS, C.M.; BAEVERFJORD, A.; KROGDAHL, A.; LANDSVERK, T. (2000). Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *J. Fish Dis.*, 23(2): 115-127.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. (2004). Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *J. Aquacult. Trop.*, 19: 239–242.

BEVERIDGE, M.C.M. (2001). *Aquaculture and wildlife interactions. Environmental Impact Assessment of Mediterranean aquaculture farms*. Ed. CIHEAM, FAO, Zaragoza. 57-66.

BLOG DE BIOLOGÍA, 2007. *Factores que afectan a la actividad enzimática*, visto el 20 de mayo de 2017
<https://www.blogdebiologia.com/factores-que-afectan-la-actividad-enzimatica.html>

C

CALABUIG, A. (2014). *Efecto de la sustitución de la harina de pescado por harina de carne como fuente proteica alternativa en el crecimiento y aprovechamiento nutritivo de la dorada (Sparus aurata)*. Proyecto Final de Grado. Universitat Politècnica de València. 57pp.

D

DEGUARA, S.; JAUNCEY, K.; AGIUS, C. (2003). Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology.*, 62: 1033-1043.

DIREKBUSARAKOM, S.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y.; RUANGPAN, L.; DANAYADOL, Y. (1998). *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J. Mar. Biotechnol.*, 6: 266–267.

E

ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271-278.

ESTRUCH, G.; COLLADO, M.C.; PEÑARANDA, D.S.; TOMÁS, A.; JOVER, M.; PERÉZ, G.; MARTÍNEZ, S. (2015). Impact of Fishmeal Replacement in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) on the Gastrointestinal Microbiota Determined by Pyrosequencing the 16S Rrna Gene. *PLoS ONE.*, 10: 1-22.

F

FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture.*, 199: 197-227.

G

GARCÍA-CARREÑO, FL.; NAVARRETE DEL TORO, MA.; EZQUERRA, M. (1997). Digestive Shrimp Proteinases for the Evaluation of Protein Digestibility. I. The Effect of Proteinase Inhibitors in Protein Ingredients. *Journal of Marine Biotechnology.*, 5:36-40.

GARRIQUES, D.; AREVALO, G. (1995). An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. en: Browdy, C.L.; Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95.* Baton Rouge, World Aquaculture Society, pp. 53–59.

GIRONES, R.; JOFRE, J.T.; BOSCH, A. (1989). Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol.*, 35: 1015–1021.

GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P.; MÉTAILLER, R. (2002) *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 475 pp.

H

HASAN, M.R.; METIAN, M.; TACON, A.G.J. (2011). *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects.*

J

JOVER, M.; PÉREZ, L.; ESPINÓS, F.J. (2002). *Acuicultura: Bases Biológicas, Ingeniería y Diseño de Instalaciones.* Departamento de Ciencia Animal. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. 198 pp.

K

KAMEI, Y.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y.; KIMURA, T. (1988). Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.*, 32: 67–73.

KAUSHIK, S.J. (1998). Whole body amino acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquat living Resour.*, 11:355-358.

KITAMIKADO, M.; TACHINO, S. (1960). Studies on the digestive enzymes of rainbow trout proteases. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 26: 685-690.

KLEIN, S.; COHN, S.M.; ALPERS, D.H. (1998). The alimentary tract in nutrition. en: Shils, M.E.; Olson, A.J.; Shike, M.; Ross, A.C. (Eds.), *Modern nutrition in health and disease*, pp. 605–630.

KROGDAHL, A.; LEA, T.B.; OLLI, J.J. (1994). Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino-acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Part A 107: 215-219.

KROGDAHL, A.; ROEM, A.; BAEVERFJORD, G. (1995). Effects of soybean saponin, raffinose and soybean alcohol extract on nutrient digestibilities, on growth and intestinal morphology in Atlantic salmon. *Quality in Aquaculture. Proceedings of the International Conference of Aquaculture.*, 95: 118-119.

M

MAKKAR, H.P.S. (1993). Antinutritional factors in foods for livestock. en: Gill, M.; Owen, E.; Pollot, G.E.; Lawrence, T.L.J.; Žeds. *Animal Production in Developing Countries.* Occasional publication No. 16. *British Society of Animal Production*, 69–85pp.

MARTÍNEZ-LLORENS, S.; TOMÁS, A.; MOÑINO, A.; GÓMEZ, J.; PLA, M.; JOVER, M. (2008). Blood and hemoglobin meal as protein sources in diets for gilthead sea bream (*Sparus*

aurata) Effects on growth, nutritive efficiency and fillet sensory differences. *Aquaculture.*, 39: 1028-1037.

MERINERO, S.; MARTÍNEZ, S.; TOMÁS, A.; JOVER, M. (2005). Análisis económico de alternativas de producción de Dorada en jaulas marinas en el litoral Mediterráneo español. *AquaTic.*, 23: 1-19.

MONGE, R.; MARTÍNEZ, S.; MÁRQUEZ, L.; MOYANO, F.J.; JOVER, M.; TOMÁS, A. (2016). Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Archives of Animal Nutrition*. Vol. 70 , Iss. 2.

MORIARTY, D. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture.*, 151: 333-349.

MOUTINHO, S.; MARTÍNEZ, S.; TOMÁS, A.; JOVER, M.; OLIVA, A.; PERES, H. (2016). Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. *Aquaculture.*, 468: 271-277.

MOYANO, F.J.; DIAZ, M.; ALARCON, F.J.; SARASQUETE, M.C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 121-130.

MOYANO, F.J.; ALARCÓN, F.J. (1997). Principios de nutrición en organismos acuicultivados, en: *Zootecnia Bases de Producción Animal Tomo XIII Producción Animal Acuática*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 117-130.

MOYANO, F.J. (2006) Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en nutrición. *VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mazatlán, Sinaloa, 15-17.

N

NENGAS, I.; ALEXIS, M.N.; DAVIES, S.J. (1999). High inclusion levels of poultry meals and related by products in diets for gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture.*, 179: 13-23.

P

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. (2009). The optimum dietary essential amino acid profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture.*, 296: 81-86.

PÉREZ, J.J.; WICKI, G.A.; MOYANO, F.J.; ALARCÓN, F.J. (2003). Evaluación del efecto de inhibidores de proteasas presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina. Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003, 442-454. Visto el 12 de junio de 2017 <http://www.civa2003.org>

PRIEUR, G.; NICOLAS, J.L.; PLUSQUELLEC, A.; VIGNEULLE, M. (1990). Interactions between bivalves molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 28: 227-352.

PULZ, O.; GROSS, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology.*, 65: 635-648.

R

ROBAINA, L.; IZQUIERDO, M.S.; MOYANO, F.J.; SOCORRO, J.; VERGARA, J.M.; MONTERO, D.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. (1995). Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). Nutritional and histological implications. *Aquaculture.*, 130: 219-233.

ROBAINA, L. (1998). *Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde de dorada (Sparus aurata)*. Informes Técnicos. Instituto Canario de Ciencias Marinas.

ROBYT, J. F.; WHELAN, W.J. (1968). The α -amylases. en: *Starch and its Derivates*. Radley, J. A. Ed. Chapman and Hall. London

S

SAKATA, T. (1990). Microflora in the digestive tract of fish and shell- fish. *Microbiology in Poecilotherms* Ed. Elsevier. Amsterdam.

SANZ, A.; MORALES, A.E.; DE LA HIGUERA, M.; CARDENETE, G. (1994). Sunflower meal compared with soybean meal as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: protein and energy utilization. *Aquaculture.*, 128: 287-300.

SCHOLZ, U.; GARCIA-DIAZ, G.; RICQUE, D.; CRUZ-SUAREZ, L.E.; VARGASALBORES, F.; LATCHFORD, J. (1999). Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture.*, 176: 271– 283.

SCOTTISH EXECUTIVE, (2002). *Review and synthesis of the environmental impacts of aquaculture*. Report by the Scottish Association for Marine Science and Napier University published by the Scottish Executive Central Research Unit, Edinburg.

SILVA, F.C.P.; NICOLI, J.R.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; LE GALL, M.M.; KAUSHIK, S.; GATESOUBE, F.J. (2010). Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream *Sparus aurata* and goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture.*, 306: 233-237.

SPINREACT (2013). *Determinación cuantitativa de leucina aminopeptidasa (LAP)*. Visto el 25 de mayo de 2017.

http://www.spinreact.com/files/Inserts/Bioquimica/BEIS15_LAP_2013.pdf

SUGIURA, S.H.; RABOY, V.; YOUNG, K.A.; DONG, F.M.; HARDY, R.W. (1999). Availability of phosphorus and trace elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.*, 170: 285-296.

V

VENOU, B.; ALEXIS, M.N.; FOUNTOULAKI, E.; NENGES, I.; APOSTOLOPOULOU, M.; CAST RITSI-CATHARIOU, I. (2003). Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture.*, 225: 207-223.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. (2004). In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol.*, 231: 145–152.

W

WHITAKER, J.R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. 2a ed., Marcel Dekker, INC, New York.

Y

YÚFERA, M.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; VIDAURRETA, A.; CARA, J.B.; MOYANO, F.J. (2004). Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology.*, 144: 863-869.