



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Máster Universitario en Acuicultura
Valencia

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Efecto de la alimentación en el crecimiento y actividad enzimática del lumpo (*Cyclopterus lumpus*)

Presentado por

Cerdà Molins, Marina

Para la obtención del

Máster Universitario en Acuicultura Valencia

Curso: 2020/2021

Fecha: Convocatoria Septiembre

Tutor: Tomás Vidal, Ana

Tutor: Martínez Llorens, Silvia

Resumen

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por una mezcla de concentrado de proteínas vegetales sobre el crecimiento y las actividades de los enzimas digestivos del pez lumpo (*Cyclopterus lumpus*). El experimento se llevó a cabo con lumbos con un peso inicial de $4 \pm 0,01$ g y tuvo una duración de 54 días. Se formularon 4 piensos experimentales, las cuales se ensayaron en tanques por triplicado; un pienso control (CTRL) basada en harina de pescado (HP), y tres piensos que contenían concentrado de proteína de soja (CPS) y concentrado de proteína de guisante (CPG) sustituyendo la HP en un 25% (PP25), 50% (PP50) y 75% (PP75). El crecimiento de los peces multiplicó de 5 a 6 veces su peso inicial en 54 días. En cuanto a la actividad de los enzimas digestivos, el pienso PP25 presentó una actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP) más alta que en el resto de los peces alimentados con los otros piensos, mientras la actividad enzimática de la tripsina (TRP) fue mayor en los alimentados con el pienso PP50. En cambio, la actividad total de la proteasa alcalina (TAP) y la TRP fue menor en los peces alimentados con el pienso PP75. Además, las actividades enzimáticas también se vieron afectadas significativamente en las diferentes regiones del tracto intestinal, así pues, la LAP y TRP fueron significativamente mayores en el intestino medio (IM). En general, estos resultados indican que se puede sustituir el 50% de HP por una mezcla de CPS y CPG sin ningún efecto adverso relevante en la actividad de los enzimas digestivos con una mejora incluso en el crecimiento de los peces.

Palabras clave: lumpo, harina de pescado, concentrado de proteína de soja y de guisante, enzimas digestivas.

Resum

En el present treball s'ha estudiat l'efecte de la substitució parcial de la farina de peix per una barreja de concentrat de proteïnes vegetals sobre el creixement i les activitats dels enzims digestius del peix lumpus (*Cyclopterus lumpus*). L'experiment es va dur a terme amb lumpsos amb un pes inicial de $4 \pm 0,01$ g i va tenir una durada de 54 dies. Es van formular quatre pinsos experimentals, les quals es van assajar en tancs per triplicat; un pinso control (CTRL) basada en farina de peix (HP), i tres pinsos que contenien concentrat de proteïna de soja (CPS) i concentrat de proteïna de pèsol (CPG) substituint la HP en un 25% (PP25), 50% (PP50) i 75% (PP75). El creixement dels peixos va multiplicar de 5 a 6 vegades el seu pes inicial en 54 dies. Pel que fa a l'activitat dels enzims digestius, el pinso PP25 presentar una activitat de la leucina aminopeptidasa (LAP) més alta que a la resta dels peixos alimentats amb els altres pinsos, mentre l'activitat enzimàtica de la tripsina (TRP) va ser més gran en els alimentats amb el pinso PP50. En canvi, l'activitat total de la proteasa alcalina (TAP) i la TRP va ser menor en els peixos alimentats amb el pinso PP75. A més, les activitats enzimàtiques també es van veure afectades significativament en les diferents regions del tracte intestinal, així doncs, la LAP i TRP van ser significativament majors en l'intestí mitjà (IM). En general, aquests resultats indiquen que es pot substituir el 50% d'HP per una barreja de CPS i CPG sense cap efecte advers rellevant en l'activitat dels enzims digestius amb una millora fins i tot en el creixement dels peixos.

Paraules clau: lumpus, farina de peix, concentrat de proteïna de soja i de pèsol, enzims digestius.

Abstract

In the present work, the effect of the partial substitution of fish meal by a mixture of vegetable protein concentrate on the growth and activities of the digestive enzymes of the lump fish (*Cyclopterus lumpus*) has been studied. The experiment was carried out with lumpos with an initial weight of 4 ± 0.01 g and lasted 54 days. 4 experimental feeds were formulated, which were tested in tanks in triplicate; a control feed (CTRL) based on fish meal (HP), and three feeds containing soy protein concentrate (CPS) and pea protein concentrate (CPG) replacing HP by 25% (PP25), 50% (PP50) and 75% (PP75). The growth of the fish multiplied its initial weight by 5 to 6 times in 54 days. Regarding the activity of digestive enzymes, the PP25 diet presented a higher leucine aminopeptidase (LAP) activity than in the rest of the fish fed with the other feed, while the enzymatic activity of trypsin (TRP) was higher in those fed with the PP50 feed. On the other hand, the total activity of alkaline protease (TAP) and TRP was lower in fish fed PP75 feed. Furthermore, enzyme activities were also significantly affected in the different regions of the intestinal tract, thus, LAP and TRP were significantly higher in the midgut (MI). In general, these results indicate that 50% HP can be replaced by a mixture of CPS and CPG without any relevant adverse effect on the activity of digestive enzymes with an improvement even in fish growth.

Key words: lump, fish meal, soy and pea protein concentrate, digestive enzymes.

Abreviaturas

AA: Aminoácidos

ALP: Fosfatasa alcalina

ANT: Factores antinutricionales

ATC: Ácido tricloroacético

CC: Ciego pilórico

CPG: Concentrado proteico de guisante

CPS: Concentrado proteico de soja

CTRL: Pienso control

HCl: Ácido clorídrico

HFM: Pienso de harina de pescado y proteínas de pescado hidrolizadas

HP: Harina de pescado

HS: Harina de soja

IA: Intestino anterior

ID: Intestino distal

IM: Intestino intermedio

LAP: Leucina amino peptidasa

PP25: Pienso donde se sustituyó el 25% de HP

PP50: Pienso donde se sustituyó el 50% de HP

PP75: Pienso donde se sustituyó el 75% de HP

TAP: Proteasa alcalina total

TRP: Tripsina

ÍNDICE

Resumen	II
Resum	III
Abstract	IV
Abreviaturas	V
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción de la especie, biología y distribución	1
1.2 Control biológico y su relación con la producción de lumpo	1
1.3 Producción de caviar	4
1.4 Comportamiento alimentario	5
1.5 Composición del alimento. Proteínas vegetales y enzimas digestivas ..	7
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
3 MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1 Peces y control de pesos	12
3.2 Piensos experimentales	12
3.3 Actividad enzimática digestiva y ensayo proteico	14
3.3.1 Actividad total de proteasa alcalina	14
3.3.2 Actividad de la tripsina	14
3.3.3 Actividad de Leucina aminopeptidasa	14
3.3.4 Actividades enzimáticas específicas	15
3.4 Análisis estadístico	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Rendimiento del crecimiento	16
4.2 Efecto del pienso en la actividad enzimática	17
4.2.1 Actividad total de la proteasa alcalina (TAP)	17
4.2.2 Tripsina	17
4.2.3 Leucina Aminopeptidasa (LAP)	18
4.2.4 Proteína Bradford	19
4.3 Actividad enzimática por sección	19
5 DISCUSIÓN	21
6 CONCLUSIONES	23
7 BIBLIOGRAFÍA	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Lumpo.	1
Figura 2: Piojos del mar en el salmón	2
Figura 3: Número de ejemplares de lumpo en Noruega entre el 2015 y el 2019	3
Figura 4: Caviar de lumpo	4
Figura 5: Bloque de pienso con ranuras.....	6
Figura 6: Actividad de la proteasa alcalina total (TAP) según el pienso suministrado	17
Figura 7: Actividad de la tripsina según el pienso suministrado	18
Figura 8: Actividad de la enzima leucina aminopeptidasa según el pienso suministrado	18
Figura 9: Actividad enzimática de la proteína Bradford según el pienso suministrado	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Consumo estimado de caviar procedente de lumpo en diferentes zonas a nivel mundial	5
Tabla 2: Composición de los piensos experimentales (g / 100g pienso)	13
Tabla 3: Evolución del peso del pez lumpo alimentados con los diferentes piensos	16
Tabla 4: Actividad enzimática de la tripsina, LAP, TAP y proteína Bradford en las diferentes secciones.	20

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción de la especie, biología y distribución

El lumpo pertenece a la familia Cyclopteridae del orden perciformes, y es la única del género monoespecífico *Cyclopterus* (**Figura 1**).

Sus cuerpos son comprimidos, con la cabeza relativamente pequeña y grandes aberturas branquiales. Tienen tubérculos óseos bien desarrollados en cabeza y cuerpo. Existen 3 filas distintas de tubérculos grandes lateralmente, con unos más pequeños esparcidos entre filas, que son característicos de esta familia de peces. Además, las aletas pélvicas de estos peces han evolucionado en discos succionadores ventrales, que usan para adherirse al sustrato.

Esta especie habita en los fondos rocosos, aunque se pueden encontrar entre algas flotantes. Se alimentan de ctenóforos, medusas, pequeños crustáceos, gusanos poliquetos y peces pequeños. Se trasladan a la costa en verano para desovar. Los huevos son muy valorados para la producción de caviar económico.

Se pueden encontrar en el atlántico septentrional, desde el báltico hasta el golfo de Finlandia, y muy raramente frente a la costa de Portugal.



Figura 1: Lumpo. Fuente: Fishbase, 2021

1.2 Control biológico y su relación con la producción de lumpo

Los piojos del mar son responsables de muchos brotes de enfermedades en la acuicultura intensiva de los salmónidos; estos rozan la piel y el tejido mucoso del pez, y le pueden causar infecciones secundarias o problemas osmóticos, que, si no se tratan, pueden llegar a producir la muerte al pez (Imsland *et al.*, 2014). (**Figura 2**)



Figura 2: Piojos del mar en el salmón

Esto ocasiona pérdidas económicas importantes en la industria del salmón atlántico, pues los caros tratamientos junto con el detrimento en el crecimiento del pez, un mayor desperdicio del alimento y la reducción de la calidad del producto final hace que estas pérdidas asciendan a más de 150 millones de euros al año sólo para piscicultores noruegos (Bergheim, 2012).

La industria de la acuicultura ha estado usando durante años tratamientos quimioterapéuticos y medicamentos para evitar los daños producidos por los piojos de mar, pero el uso continuado y prolongado de estos produce resistencias, por lo que se ha estado buscando una alternativa más rentable y sostenible. Se ha podido comprobar que ésta podría ser el uso de peces limpiadores. El uso de peces limpiadores es particularmente atractivo ya que puede reducir el uso de quimioterapéuticos, además, puede ser más rentable que la medicación, y sin duda, es potencialmente menos estresante para los peces de piscifactoría (Powell *et al.*, 2018). El uso de peces limpiadores ha ido aumentando considerablemente desde el 2015 hasta la fecha. Noruega utilizó 26 millones de ejemplares durante 2015, y se ha ido incrementando hasta 61 millones en 2019, de los cuáles 10 millones corresponden al lumpo en 2015 (**Figura 3**), y alrededor de 43 millones en 2019 (Dirección de Pesca de Noruega, 2020). Esto lo convierte en la segunda especie de acuicultura con mayor representación en Noruega.

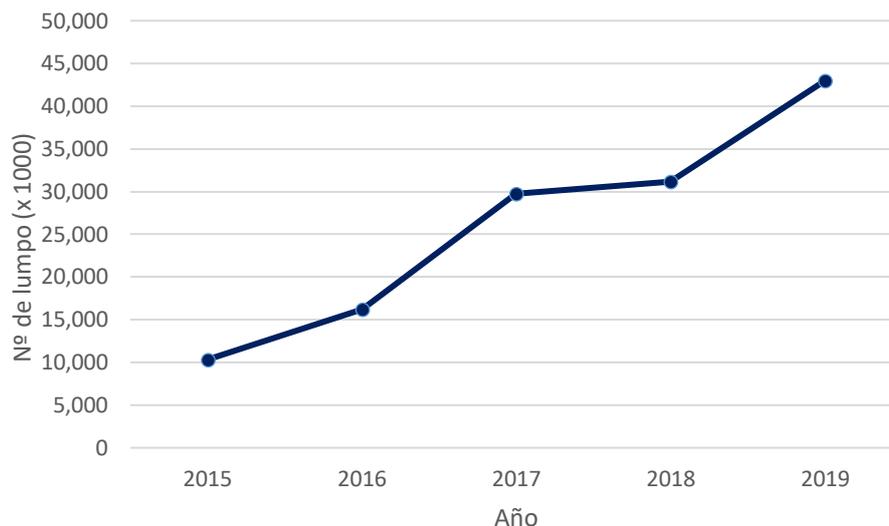


Figura 3: Número de ejemplares de lumpo en Noruega entre el 2015 y el 2019. Fuente: Dirección de Pesca de Noruega (2020)

Se ha estado investigando varios tipos de peces, como son los lábridos, sin embargo, requieren de latencia invernal y no pueden alimentarse por debajo de 6 °C. En cambio, el lumpo común puede seguir alimentándose hasta temperaturas de 4 °C, y estar listo para su traslado a las granjas de salmones con 4 meses (Powell *et al.*, 2018). Y debido a que éstos precisan un rango de temperatura de 4 a 12 °C, hace que el lumpo común sea una buena opción. Anteriormente, la poca atención que había recibido el lumpo se había limitado a la producción de huevos y se vendía como sustituto de caviar más económico (Powell *et al.*, 2018). Por lo tanto, comprender las preferencias de alimentación de esta especie es esencial para aumentar la eficacia del despiojado sin comprometer el bienestar o el crecimiento de los salmones. Asimismo, existen datos que sugieren que puede haber un componente de aprendizaje cuando meten a los peces lumpo en jaulas marinas junto a los salmones:

- Un punto de estudio es la cantidad exacta de peces necesarios para incluir en las jaulas marinas con los salmones de manera que la eficacia sea máxima, pero primeramente la especie debe criarse completamente en cautividad.
- Otro aspecto que se está investigando, son las características de la población de peces lumpo de diferentes orígenes, para conocer cuáles son las más deseables para emplearse como pez limpiador en las jaulas de producción de salmón atlántico (Powell *et al.*, 2018).
- Para aumentar el uso sostenible de esta especie, es interesante la reutilización del pez lumpo después del despiojado. Éste se puede usar en la selección de líneas en programas de cría en cautividad, así como para alimentar animales e incluso para el consumo humano.

Sin embargo, no todo son ventajas al utilizar especies limpiadoras, por ello también es importante profundizar el alcance y la incidencia de enfermedades infecciosas y los riesgos que pueden representar para el salmón atlántico, pues se desconoce hasta qué punto los lumpo pueden ser susceptibles a las enfermedades enumeradas en las reglamentaciones sanitarias actuales. En conclusión, el uso de peces limpiadores es

una alternativa eficaz y beneficiosa para el medio ambiente, para eliminar los piojos de mar y reducir el estrés del salmón atlántico debido a la menor manipulación que se asocia con el baño medicinal o el tratamiento mecánico, con la precaución de que los peces limpiadores deben estar sanos para optimizar la eliminación de los piojos. No obstante, y como se ha comentado anteriormente algunos de ellos presentan un gran potencial para la industria acuícola. Como toda nueva especie, se debe de profundizar en sus necesidades, tanto ambientales, como nutricionales, para obtener de ella un buen rendimiento y beneficio comercial.

1.3 Producción de caviar

El caviar del lumpo era originalmente una imitación del caviar del esturión porque sus huevas eran de tamaño y color similar (**Figura 4**). Ahora se ha convertido en un producto propio, y cada año se venden entre 3.000 y 4.000 toneladas de caviar. En Europa, el caviar se vende principalmente en tarros de vidrio de 50 y 100 g.



Figura 4: Caviar de lumpo

Este caviar es producido principalmente por Dinamarca, Alemania, Islandia y Suiza. Todos ellos exportan el caviar a otros países como Francia y Estados Unidos. Europa es el principal mercado de este caviar con un 80% respecto al mundial, Francia consume el 30%, Alemania el 20% y España aproximadamente el 10% (**Tabla 1**).

La demanda por este producto es relativamente constante, y varía entre 30.000 y 35.000 barriles por año, cada barril tiene un volumen aproximado de 135 L. Respecto al precio va variando cada año dependiendo del país exportado.

Tabla 1: Consumo estimado de caviar procedente de lumpo en diferentes zonas a nivel mundial. Fuente: Klinkhardt, 2002a; FAO, 2002

País o región	Consumo estimado en todo el mundo (%)
Europa, del cual	80
Francia	30
Alemania	20
España	10
Italia	10
Otros países de Europa	10
América	15
Asia	3
Otros países fuera de Europa	2
Mundial	100

1.4 Comportamiento alimentario

El comportamiento alimentario del pez lumpo en jaulas marinas se puede clasificar como oportunista, es decir, no ingiere solo de una fuente de alimento si hay otras presentes en su entorno (Imsland *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que los peces lumpo de pequeño tamaño consumen más piojos del mar, y eso es debido a que se decantan más por los alimentos naturales, en cambio, los peces lumpo de tamaño mediano y grande, compiten mínimamente con el salmón atlántico por los pellets, sin afectar negativamente al crecimiento del salmón atlántico.

La temperatura óptima para el crecimiento de los peces juveniles disminuye cuando aumenta el peso corporal, es decir, los peces más pequeños necesitan mayor temperatura que los más grandes para un buen crecimiento (Imsland *et al.*, 2014).

Durante el invierno, los entornos de las jaulas marinas carecen de especies de zooplancton que se encuentran libremente, y para mantener las poblaciones de peces lumpo saludables, por lo que se requiere de una fuente de alimento adicional (Imsland *et al.*, 2016).

La estrategia de alimentación más común es mediante pienso extrusionado que se distribuye con comederos automáticos colocados en el lado de la jaula, aunque se están diseñando nuevas estrategias de alimentación. Se han diseñado distintos diseños de bloques de alimentación con superficie lisa y con ranuras, siendo este último el más exitoso, ya que aprovechaban las ranuras para alimentarse (**Figura 5**). Esto se debe a la morfología de su boca la cual es no protráctil, redondeada y sin dientes, lo cual provoca que sean incapaces de alimentarse de una superficie lisa (Imsland *et al.*, 2018). Una ventaja de usar estos bloques es que se pueden distribuir en zonas de la jaula cercanas al salmón atlántico, y así, aumentan las interacciones entre el salmón atlántico y el lumpo, mejorando el potencial de pastoreo de piojos. No obstante, la alimentación en bloques tiene ciertas desventajas como son la disminución de la estabilidad del bloque con el tiempo, y, además, que los peces gastan más energía que los que se alimentan por pellets debido a una mayor competencia entre ellos probablemente relacionado con las jerarquías de alimentación lo que produce una mayor variación en el crecimiento en el grupo de bloques de piensos (Imsland *et al.*, 2019).

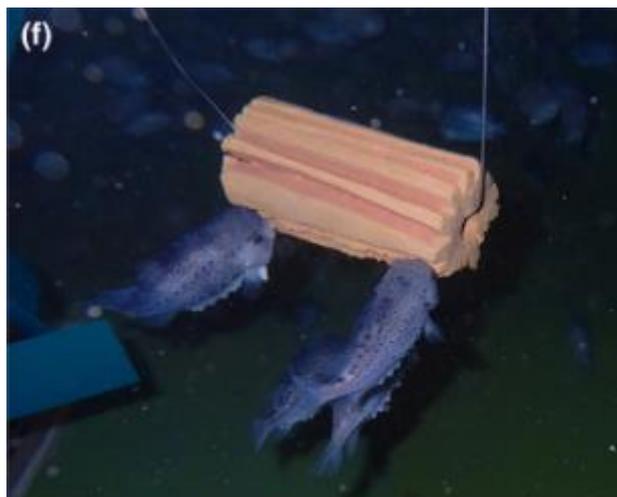


Figura 5: Bloque de pienso con ranuras. Fuente: Imsland, 2018

Otra alternativa a la estrategia de alimentación por bloques es combinar éstos con sustratos artificiales, para que los peces puedan descansar cuando no están buscando comida, para evitar el estrés y aumentar la eficacia de pastoreo de piojos (Imsland *et al.*, 2018).

Existen varios estudios se ha observado que los peces desarrollan cataratas lo que se atribuye a alteraciones en el metabolismo y a la desnutrición; existen dos tipos de cataratas:

- Las bilaterales que tienen causas sistemáticas, relacionadas con nutrición y otros factores ambientales.
- Las unilaterales, que se asocian con tensiones mecánicas externas en los peces, como, por ejemplo, los diferentes tipos de manipulación, la alta densidad de población y enfermedades infecciosas.

Estas alteraciones ponen de manifiesto que hay un problema de bienestar y que las cataratas están relacionadas fuertemente con una nutrición subóptima. Imsland (2019), analizó tres grupos de peces lumpo; uno que lo alimentaban los 7 días de la semana, otro grupo que los alimentaban 4 días, y el último grupo lo alimentaban 3 días. Hubo una mayor incidencia de peces con cataratas bilaterales en comparación con los peces con cataratas unilaterales y se reveló que los peces alimentados 3 días a la semana tenían un 53% menos de prevalencia de cataratas en comparación con los peces que se alimentaban a diario, y un 48% que los que se alimentaban 4 días. Una prevalencia tan alta de cataratas solo se puede comparar con las encontradas anteriormente en el salmón atlántico debido a un pienso deficiente en histidina. Además, este estudio también reveló que los peces con una alta tasa de crecimiento específico tenían mayor incidencia de cataratas.

En otro trabajo, (Imsland *et al.*, 2018), compararon tres tipos de piensos diferentes en niveles de vitamina C y astaxantina, y se observó que el grupo de peces alimentados con el pienso que tenía mayor contenido de vitamina C y de astaxantina, presentaba menor prevalencia de cataratas, en cambio, el grupo alimentado con el pienso C, tenía la mitad de vitamina C y astaxantina y tenía una gran prevalencia de cataratas.

Es importante tratar las cataratas, especialmente en el lumpo, pues una mejora de visión puede llevar a un aumento de eficiencia del pastoreo de los piojos del mar y, además, un mejor bienestar del pez.

1.5 Composición del alimento. Proteínas vegetales y enzimas digestivas

Es esencial la sustitución de la harina de pescado (HP) en los piensos vegetales en el pez lumpo, debido no se trata de una especie que está enfocada para la producción y por eso es necesario buscar otro tipo de ingredientes para minimizar el coste del pienso y hacer más sostenible la producción de peces en acuicultura.

Al ser una especie nueva en la acuicultura se sabe muy poco sobre el efecto que tienen los ingredientes vegetales, pero es necesario comprender cómo afectan al desarrollo y crecimiento de esta especie (Willora *et al.*, 2020).

La industria de piensos para peces durante años ha ido aumentando los ingredientes derivados de vegetales. La harina de soja (HS) puede sustituir parte o totalmente la HP para algunas especies omnívoras como es la tilapia (*Oreochromis niloticus*) sin afectar a cambios en el crecimiento o en la composición del filete (Refstie *et al.*, 2000). La HS es una fuente de proteína barata, muy disponible, de un alto valor nutricional y además con un perfil de aminoácidos (AA) equilibrado (Krishnan & Jez, 2018). Pero la soja contiene factores antinutritivos (ANT) que, ha restringido el uso de este ingrediente en alimento para peces, pero la mayoría de ANT pueden eliminarse o inactivarse, mediante la aplicación de altas temperaturas, lo que permite que se pueda incluir en mayor cantidad en los piensos de los peces sin afectar la digestibilidad de los nutrientes (Mambrini *et al.*, 1999). Los productos de soja se han utilizado con éxito para sustituir la HP en los piensos de especies de peces carnívoros (Voorhees *et al.*, 2019), sin embargo, una sustitución muy alta afecta negativamente al rendimiento de la producción (Murashita *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

La incorporación de proteínas vegetales al pienso, puede ser un sustituto rentable, sostenible y viable de la HP. Sin embargo, la sustitución total de esta harina de pescado es aún un desafío, pues los ingredientes vegetales producen efectos negativos como un desequilibrio del perfil de aminoácidos esenciales, una mala palatabilidad, peor digestibilidad como consecuencia de un mayor contenido en fibra y la presencia de ANT (Zhang *et al.*, 2012).

La baja palatabilidad se puede atribuir a la reducción de atrayentes dietéticos proporcionados principalmente por la HP, aunque también puede ser debido a los componentes disuasorios que tienen los ingredientes derivados de plantas (Zhang *et al.*, 2012).

Casi todos los ingredientes de las proteínas vegetales que se usan normalmente contienen ANT, e incluyen entre otros, inhibidores de enzimas, análogos de hormonas componentes metabólicamente activos, como las toxinas o compuestos antinutritivos e incluso altos niveles de fibra, los cuales son específicos de cada materia prima (Francis *et al.*, 2001).

Los inhibidores de proteasas son sustancias antinutritivas que contienen muchos ingredientes de origen vegetal que podrían usarse en la alimentación de los peces, en concreto las legumbres (Norton, 1991). Su potencia depende de su origen y de la enzima

diana. La soja contiene inhibidores de proteasa que pueden reducir la digestibilidad de las proteínas (Kalhor *et al.*, 2018; Rahmah *et al.*, 2016).

Con todo esto, se sabe que la disminución del valor nutritivo de proteínas vegetales en piensos para peces está altamente relacionada con la presencia de estos factores antinutritivos. El efecto negativo del uso de piensos que contienen inhibidores en el crecimiento de los peces podría deberse a diferentes factores, como son, el tipo de harinas que se utiliza, la cantidad de éstas que están incluidas, la duración del periodo de alimentación y la sensibilidad de las especies específica para cada factor antinutritivo (Pérez *et al.*, 2003).

Es evidente que ni todos los inhibidores de proteasas en vegetales son iguales, ni están presentes en la misma cantidad. Estos compuestos han sido identificados en una gran diversidad de especies vegetales, y son particularmente abundantes en semillas de leguminosas, pero también en cereales y subproductos. Pérez (2003) evaluó el efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de proteasas alcalinas en tres ingredientes vegetales (salvado de trigo, texturizado de soja y afrechillo de arroz) para pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*), y concluyó que había efecto inhibitorio de la actividad enzimática de proteasa alcalinas con concentraciones moderadas de estos ingredientes vegetales y una inhibición total con concentraciones más elevadas.

El uso de una mezcla de varios ingredientes proteicos de origen vegetal puede mejorar el equilibrio de los nutrientes en el pienso, e incluso se puede diluir o mitigar los compuestos antinutritivos y por lo tanto incluirlos en el pienso de los peces carnívoros en mayor proporción (Zhang *et al.*, 2012; Monge *et al.*, 2015).

Por lo tanto, es importante recalcar que la digestión y la absorción de nutrientes depende en gran medida de la actividad de las enzimas digestivas. La actividad de estas enzimas en el tracto digestivo se puede utilizar como un indicador de la capacidad digestiva y el estado nutricional de los peces (Martinez-Llorens *et al.*, 2021). Dado que los peces carecen de actividad enzimática a nivel bucal, la digestión química se produce en el estómago e intestino.

En el estómago de los peces existe gran actividad proteolítica, debido a la acción de proteasas secretadas por las células glandulares del estómago. La proteasa más frecuente es la pepsina, y otras moléculas con una actividad análoga de la pepsina. La pepsina es producida en forma de pepsinógeno (su forma inactiva) que es activada por la presencia de un medio ácido (HCl) y su actividad máxima se da en un pH ácido en torno a 2. La pepsina descompone las proteínas en polipéptidos y aminoácidos. Ésta no es una enzima esencial para la digestión de las proteínas, ya que en algunas especies de peces no poseen actividad de pepsina, que son los llamados “peces sin estómago”, por lo que la digestión proteica se realiza a pH básico. En ciertos peces existe una actividad no proteolítica en su jugo gástrico. Estos peces se alimentan de crustáceos que contienen un caparazón de quitina, y se ha detectado presencias de quitinasas, que rompen ese exoesqueleto para facilitar la digestión intestinal. El pH óptimo para la actividad de las quitinasas es de 4,5 – 5,1 (Zamora & Rubio, 2009).

En el intestino es donde se produce la mayoría de los procesos químicos que concluyen en la digestión total de los alimentos. Esto se produce por la acción de diferentes enzimas que proceden de la pared intestinal, páncreas o hígado. La bilis se produce en el hígado y se acumula en la vesícula biliar. Facilita la digestión de los lípidos, y regula el pH del intestino. El páncreas produce gran diversidad de enzimas que digieren proteínas (proteasas), los carbohidratos (glucosidasas) y los lípidos (lipasas).

Las proteasas (tripsina, quimotripsina, colagenasa y elastasa) son secretadas en el páncreas en forma de zimógenos y son activados por la enteroquinasa y la tripsina en el interior del intestino. Las más importantes son la tripsina y la quimotripsina.

La tripsina se secreta en forma de tripsinógeno y es activado por la enteropeptidasa. Su sustrato son proteínas y péptidos grandes que hidroliza para producir otros de menor tamaño y su función como activador enzimático hace que esta enzima sea clave para la digestión de las proteínas. Su pH óptimo es entre 8 y 9 según la especie y su temperatura óptima es de 30 a 40 °C. La quimotripsina se origina por la acción de la tripsina sobre el quimotripsinógeno, también hidroliza proteínas y péptidos de gran tamaño para producir péptidos de menor tamaño (Zamora & Rubio, 2009).

La elastasa es otra endopeptidada que se secreta en forma de proelastasa y es activada por la tripsina. Actúa sobre la elastina, que es una proteína fibrosa de las arterias y ligamientos, y que es resistente a otras proteasas, además de hidrolizar insulina, ribonucleasas y algunas proteínas de origen microbiano. Esta enzima no se encuentra en todas las especies de peces. Y las colagenasas, hidroliza proteínas fibrosas del tejido conectivo, colágeno, piel, huesos y tendones.

La secreción más destacable que se produce en el intestino es la aminopeptidasa, y actúa sobre el intestino también. Se trata de unas exopeptidasas que hidrolizan el extremo amino-terminal produciendo aminoácidos libres que son absorbidos por la pared intestinal (Zamora & Rubio, 2009).

La fosfatasa alcalina (ALP) participa en la regulación de la absorción de lípidos (ácidos grasos) y minerales, como calcio y fósforo. También tiene un papel en el control de la secreción de bicarbonato por la mucosa, contribuyendo así a la regulación del pH de la superficie de la mucosa (Martínez-Llorens *et al.*, 2021).

Entre los compuestos antinutritivos, la inhibición de la actividad de la tripsina es una de las comunes, especialmente cuando se emplean leguminosas (Francis *et al.*, 2001), lo que puede afectar a su vez al resto de actividad de enzimas digestivas y, por lo tanto, a la biodisponibilidad de los nutrientes y particularmente de los AA. Se ha visto en diversos estudios que las fuentes de proteína vegetal pueden tener efectos negativos en la actividad de la pepsina, tripsina y quimotripsina en la dorada y otras especies, como es el caso del estudio (Robaina *et al.*, 1998) que empleó harina de soja y altramuz al 10, 20 y 30% en dorada, y vio que la actividad enzimática de la tripsina se redujo en los peces alimentados con los piensos que contenían un 30% de harina de soja. En este otro estudio (Pervin *et al.*, 2020) determinó el efecto de la sustitución de la HP en diferentes niveles de HS; CTRL, 25%, 50% y 75% en el pienso de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas, y concluyó que el pienso de la tilapia puede ser sustituida hasta un 75% de HS sin efectos negativos en el crecimiento y en la actividad de las enzimas digestivas. En este estudio también se observó que a medida que el pienso contenía más HS la actividad de las proteasa, lipasa y amilasa iba disminuyendo en el estómago y en el intestino. Murashita *et al.* (2015) informaron una actividad de tripsina, quimotripsina, lipasa y amilasa significativamente menor en el intestino de pargo rojo (*Pagrus major*) alimentada con el pienso de HS en comparación con los peces alimentados con HP.

Aunque se sabe muy poco sobre el pez lumpo, un reciente estudio (Willora *et al.*, 2020) mostró que, en los piensos para los peces juveniles, la sustitución de HP por concentrado proteico de soja (CPS) y concentrado proteico de guisante (CPG) al 50% no tuvo efectos negativos en el crecimiento, en la composición química corporal, pero

no se estudió el efecto de esta sustitución en la actividad enzimática. La actividad enzimática varía con la edad del pez, su estado fisiológico y la estación, además de que existen factores que afectan a esta actividad como son la temperatura, el pH, la presencia de inhibidores y la concentración del sustrato, por lo que se ve necesario evaluar cómo afectaría en cada especie, cuando se varía su alimentación.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La industria del salmón atlántico sufre anualmente elevadas pérdidas económicas causadas por los tratamientos que se efectúan por la infestación de piojos del mar, lo cual conlleva mermas importantes en la calidad del producto final, reducción del crecimiento de los peces y pérdida de la rentabilidad productiva (Imsland *et al.*, 2014). A todas estas pérdidas, se suma el impacto medioambiental que se produce por el uso continuado de tratamientos quimioterapéuticos y medicamentos originando resistencia en los piojos.

Debido a todo ello, se ha empezado a utilizar una alternativa más rentable y sostenible. Se trata de los peces limpiadores, como es el lumpo común, para el control de estas infestaciones. Estos peces se alimentan de los piojos del mar que están en los salmones.

En estudios realizados previamente, se ha comprobado que cuanto más se alimenta el pez lumpo del piojo de mar, es en estado juvenil, pues se decanta por alimento más natural. En cambio, al crecer compiten mínimamente con el salmón por los pellets, aunque no se ha comprobado que afecte negativamente a la eficiencia nutritiva del salmón atlántico (Imsland *et al.*, 2014). Es por ello, que su potencial como peces limpiadores no se puede utilizar cuando van alcanzando aproximadamente un peso de 350 g.

Además, la producción de peces que se supone es de hábito omnívoros por su tipo de alimentación en el medio natural, pueden aprovecharse adicionalmente para otros usos, como la producción de caviar económico, algo muy demandado en el mercado europeo actualmente. Sin embargo, como nueva especie en la acuicultura, se sabe muy poco sobre el comportamiento, las necesidades nutritivas y el efecto de la composición del pienso sobre la fisiología digestiva (Willora *et al.*, 2020), así como los efectos de sustitución de harina de pescado por harinas vegetales.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue contribuir al conocimiento de la fisiología digestiva del lumpo mediante la evaluación de su capacidad digestiva, empleando como indicador de ésta, la actividad enzimática del pez alimentado con piensos con niveles decrecientes de harina de pescado, al sustituirla por concentrado proteico de soja y de guisante.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Peces y control de pesos

El experimento se realizó una vez tuvo la aprobación del Organismo institucional de Bienestar Animal y con el cumplimiento de las directrices establecidas por la Ley de Bienestar Animal de Noruega (LOV-2009-06-19-97) y la Directiva de la Unión Europea (EU/2010/63) relativa con el uso de los animales en la investigación.

Los peces fueron obtenidos de la empresa Mørkvedbukta AS, con un peso inicial de $4 \text{ g} \pm 0,01$ y fueron puestos en 12 tanques de 500 L aleatoriamente, cada tanque contenía 208 peces, en la estación de investigación de la FBA de la Universidad Nord, Bodø, Noruega (Willora *et al.*, 2020).

Antes del experimento, los peces se adaptaron a las condiciones del laboratorio durante 2 semanas y durante este tiempo se alimentaron con un pienso comercial (Gemma Silk, Skretting, Stavanger, Noruega). El experimento de alimentación se llevó a cabo durante 54 días, y durante todo el periodo experimental, la luz se atenuó para proporcionar un régimen de iluminación similar al de la práctica de cría comercial. El caudal de agua se mantuvo constante a 500 L/h, la temperatura ($7,6 \pm 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$) y el oxígeno disuelto ($86,7 \pm 0,11\%$). Al inicio y al final del experimento, 5 peces por tanque (15/tratamiento) fueron anestesiados con MS-222 (sulfonato de metano tilino tricaino; Argent Chemical Laboratories, Estados Unidos; 30 g/L), y sacrificados por un golpe en la cabeza. Se extrajo el tracto intestinal, incluido el contenido intestinal junto con los tejidos adherentes y se envolvió en un papel de aluminio; se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento del análisis enzimático.

3.2 Piensos experimentales

Los cuatro piensos fueron fabricados por la empresa SPAROS Lda. Olhao, Portugal, y contenían un 52% de proteína bruta y 21 kJ/g de energía bruta (Willora *et al.*, 2020). El pienso control (CTRL) contenía como única fuente proteica la HP; mientras que los otros tres piensos se formularon para sustituir el 25% (PP25), el 50% (PP50) y el 75% (PP75) de HP con una mezcla de CPS (concentrado de proteína de soja) y CPG (concentración de proteína de guisante) (relación 1:1). Mientras que las otras fuentes de proteínas, como fue la harina de krill, el gluten de trigo y la CPSP 90 se mantuvieron constantes. Además, los piensos se suplementaron con L-triptófano, DL-metionina, L-aurina y L-histidina para mantener los ingredientes similares en todos los piensos. La harina de trigo se usó para que el contenido de carbohidratos y del almidón se equilibrara entre los piensos, y se usó el aceite de krill para aumentar el contenido de EPA, DHA y fosfolípidos, en el aumento de los niveles de CTRL a PP75. La composición de los ingredientes de los piensos experimentales se presenta en la (**Tabla 2**).

Los piensos experimentales se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se utilizaron para la alimentación. Además, los cuatro piensos se asignaron al azar a los tanques y se usó un alimentador automático. Los peces fueron alimentados hasta saciedad aparente.

Tabla 2: Composición de los piensos experimentales (g / 100g pienso)Fuente: Willora *et al.*, 2020

Ingredientes	Pensos			
	CTRL	PP25	PP50	PP75
Harina de pescado ¹	58	43,5	29,00	14,5
Concentrado de proteína de soja ²	0	7,2	14,45	21,67
Concentrado de proteína de guisante ³	0	7,2	14,45	21,67
CPSP 90 ⁴	2,5	2,5	2,5	2,5
Harina de krill ⁵	5	5	5	5
Gluten de trigo ⁶	7,00	7,00	7,00	7,00
Harina de trigo ⁷	10,00	9,16	6,95	4,59
Almidón de guisante ⁸	5,35	5,35	5,35	5,41
Aceite de pescado ⁹	7,00	7,00	7,00	7,00
Aceite de krill ¹⁰	1,5	2,25	3,05	3,85
Premezcla de vitaminas y minerales ¹¹	1	1	1	1
Lutavit E50 ¹²	0,05	0,05	0,05	0,05
Polvo antioxidante ¹³	0,2	0,2	0,2	0,2
Propionato de sodio ¹⁴	0,1	0,1	0,1	0,1
MCP ¹⁵	0	0	0,98	2,10
Rosa Carophyll ¹⁶	0,05	0,05	0,05	0,05
Nucleótidos ¹⁷	0,5	0,5	0,5	0,5
Extracto de ajo ¹⁸	0,5	0,5	0,5	0,5
L-Histidina ¹⁹	0,25	0,25	0,25	0,25
L-triptófano ²⁰	0	0,09	0,17	0,26
DL-metionina ²¹	0	0	0,35	0,7
L-aurina ²²	1	1,1	1,1	1,1

CTRL: Control, PP25: 25% de inclusión de CPS y CPG, PP50: 50% de inclusión de CPS y CPG, PP75: 75% de inclusión de CPS y CPG.

¹NORVIK LT 70: 70,3% de proteína cruda (CP) 5,8% de grasa cruda (CF) (Sopropêche, Francia). ²Soycomil: 63% CP, 0,8% CF (ADM, Países Bajos). ³GPS de lisamina: 78% CP, 0,9% CF (Roquette Frères, Francia). ⁴Hidrolizado de proteína de pescado soluble: 82,6% CP, 9,6% CF (Sopropêche, Francia). ⁵61,1% CP, 17,4% CF (Aker Biomarine, Noruega). ⁶VITAL: 83,7% CP, 1,6% CF, (Roquette, Frères, Francia). ⁷10,2% CP; 1,2% CF (Casa Lanchinha, Portugal). ⁸NASTAR 90% almidón, (Cosucra, Bélgica). ⁹(SAVINOR UTS, Portugal). ¹⁰(Aker Biomarine, Noruega). ¹¹Vitaminas (UI o mg kg⁻¹ pienso): acetato de DL-alfa tocoferol, 100 mg; bisulfato de menadiona de sodio, 25 mg; acetato de retinilo, 20000 UI; DL-colecalciferol, 2000 UI; tiamina, 30 mg; riboflavina, 30 mg; piridoxina, 20 mg; cianocobalamina, 0,1 mg; ácido nicotínico, 200 mg; ácido fólico, 15 mg; ácido ascórbico, 1000 mg; inositol, 500 mg; biotina, 3 mg; pantotenato de calcio, 100 mg; cloruro de colina, 1000 mg, betaína, 500 mg. Minerales (go mg kg⁻¹ de pienso): carbonato de cobalto, 0,65 mg; sulfato de cobre, 9 mg; sulfato férrico, 6 mg; yoduro de potasio, 0,5 mg; óxido de manganeso, 9,6 mg; selenito de sodio, 0,01 mg; sulfato de zinc, 7,5 mg; cloruro de sodio, 400 mg; carbonato de calcio, 1,86 g; excipiente harinillas de trigo (PREMIX Lda, Portugal). ¹²(ROVIMIX E50, DSM Nutritional Products, Suiza). ¹³Paramega PX (Kemin Europe NV, Bélgica). ¹⁴Disproquímica (Portugal). ¹⁵ALIPHOS MONOCAL, 22,7% P (ALIPHOS, Bélgica). ¹⁶Carophyll Pink 10% CWS (DSM Nutritional Products, Suiza). ¹⁷Salmónidos Nucleoforce (Biolbérica, España). ¹⁸Macrogard, 67,2% de betaglucanos (Biorigin, Brasil). ¹⁹L-Histidina 98%, (Ajinomoto Eurolysine SAS, Francia). ²⁰L-Triptófano 98%, (Ajinomoto Eurolysine SAS, Francia). ²¹DL-MEIONINA PARA ACUICULTURA 99%, (EVONIK Nutrition & Care GmbH, Alemania). ²²L-Taurina 98%, (ORFFA, Países Bajos).

3.3 Actividad enzimática digestiva y ensayo proteico

Los extractos enzimáticos de ciegos pilóricos (CC), intestino anterior (IA), medio (IM) e intestino distal (ID) se prepararon mediante una disolución de muestras de tejido de 0,1 g en agua miliQ (1:10 peso: volumen) y para su homogeneización se utilizó el instrumento FastPrep®-24 Classic Instrument (MP Biomedicals, Solon, Ohio, EE. UU.) con las correspondientes condiciones: 6,5 m/s y 20 segundos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 155 min a 4 °C, y los sobrenadantes se almacenaron a - 80 °C hasta su análisis. Y las actividades de proteasa alcalina total (TAP), tripsina (TRP) y leucina aminopeptidasa (LAP) se determinaron en homogeneizados de CC, IA, IM e ID como se explicará en los párrafos siguientes:

3.3.1 Actividad total de proteasa alcalina

La actividad de la proteasa alcalina (TAP) se realizó mediante el método descrito por (Alarcón *et al.*, 1998). La actividad de la proteasa alcalina se midió usando caseína de sustrato (1%) en tampón Tris/HCl de 50 mM (a pH 8,4) con extracto de 10 µl. La mezcla fue incubada durante 40 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y la reacción se terminó añadiéndole 0,5 ml de 20% de ácido tricloroacético (ATC), seguidamente se enfriaron las muestras durante 15 minutos a - 20 °C. La absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm por espectrofotómetro (Shimadzu UV-18000, Shimadzu, Kyoto, Japón) después de centrifugarlo a 12.000 g durante 10 minutos. Todas las pruebas se hicieron por triplicado y se realizó dos muestras de control para cada muestra. Las muestras de control se establecieron mediante la adición de ATC antes del extracto de enzimas. Una unidad de actividad se definió como 1 µg de tirosina liberada por minuto en condiciones de ensayo definidas (Coeficiente de extinción de 0,0071 mL/µgcm).

3.3.2 Actividad de la tripsina

La actividad de la tripsina se midió colorimétricamente según (Natalia *et al.*, 2004). Sustratos de 50 mM: N-α-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilidina (BApNA) 200 µl con 10 µl de extracto enzimático y fue incubado durante 5 minutos a 37 °C. La absorción a 405 nm se midió usando un espectrofotómetro Ex de exploración múltiple (Thermolab Systems, Helsinki, Finlandia). Todas las mediciones se hicieron por duplicado. El aumento de la absorbancia a 405 nm se midió cada 30 segundos durante 5 minutos. Una unidad de actividad se definió como 1 µM de p-nitroanilide liberada por minuto (coeficiente de extinción molar a 8.800 M/cm).

3.3.3 Actividad de Leucina aminopeptidasa

La actividad de la enzima de leucina aminopeptidasa (LAP) también se determinó según (Natalia *et al.*, 2004). Se combinó 0,1 ml de extracto enzimático con 1,9 ml de 1,6 mM de l-leucina-p-nitroanilida (LeuNA) contenido en un sustrato de 0,0025 M MgCl₂ en tampón fosfato 60 mM (pH 7,0). El aumento de la absorbancia a 405 nm se registró

constantemente a 25 °C. Una unidad de actividad se definió como 1 µM de p-nitroanilida liberada por minuto (coeficiente de extinción molar a 8.800 M/cm).

3.3.4 Actividades enzimáticas específicas

Todas las actividades enzimáticas se expresaron en U por mg de proteína soluble total en las muestras. La concentración de proteína de la proteína soluble en extractos se determinó según (Bradford, 1976), método que utiliza albúmina sérica bovina (2 mg/ml) como estándar.

Las actividades enzimáticas específicas se calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{U}{mg \text{ proteína total}} = \frac{\Delta Abs V_{total}}{\varepsilon \times V_{muestra} t} \times \frac{ml}{mg \text{ proteína total}}$$

Donde:

ΔAbs es el aumento de la absorbancia a una longitud de onda determinada

ε es un coeficiente de extinción molar

V_{total} y $V_{muestra}$ son el volumen total y el volumen de extracto utilizado en la reacción

t es el tiempo de reacción

3.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Sigmaplot 14.0 (software Systat, San José, CA). Los datos se probaron para determinar la normalidad de las distribuciones (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de las varianzas (prueba F de Brown-Forsythe). Las medias individuales se compararon mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Para los datos no paramétricos se utilizó un análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis. Para la comparación entre medidas se empleó la prueba de *Tukey* para $p < 0,05$ y los resultados se presentaron como la media \pm error estándar.

4 RESULTADOS

4.1 Rendimiento del crecimiento

El experimento de crecimiento y aprovechamiento nutritivo se puede seguir en Willora *et al.*, (2020). En la **Tabla 3** muestra el peso corporal (g), del pez lumpo para los diferentes piensos; CTRL, PP25, PP50 y PP75. El peso final de los peces aumentó de 5 a 6 veces su peso inicial. Se observa que los peces alimentados con el pienso PP50 tuvieron mayor peso corporal, comparado con los otros piensos al final del experimento.

Existen diferencias significativas en el peso corporal entre el pienso PP50 con un valor de 46,26 g y el resto de los piensos. El pienso con mayor sustitución de HP (PP75) obtuvo un peso final menor respecto a los otros piensos, 35,84 g. En cambio, los piensos PP25 y CTRL, no presentaron diferencias significativas entre ellas.

Tabla 3: Evolución del peso del pez lumpo alimentados con los diferentes piensos
Fuente: Willora *et al.*, 2020

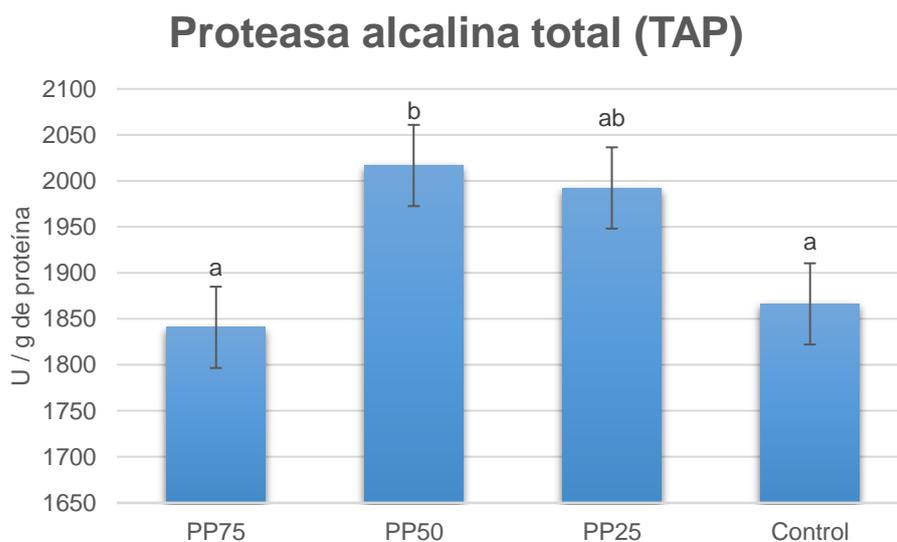
Parámetro	Período de prueba de alimentación	Niveles de inclusión de proteínas vegetales				p - Valor
		CTRL	PP25	PP50	PP75	
Parámetros de crecimiento						
Peso corporal (g)	Inicio (0 días)	6,88 ± 0,06	6,80 ± 0,06	6,83 ± 0,06	7,03 ± 0,06	0,246
	Fase continua I (19D)	14,63 ± 0,31 ^{ab}	14,25 ± 0,24 ^{ab}	15,09 ± 0,26 ^a	13,72 ± 0,34 ^b	0,021
	Fase continua II (35D)	26,34 ± 0,57	25,67 ± 0,59	26,92 ± 0,51	26,51 ± 0,63	0,286
	Fin (54 D)	40,75 ± 0,56 ^b	40,58 ± 0,59 ^b	46,26 ± 0,68 ^a	35,84 ± 0,94 ^c	<0,001

CTRL: control, PP25: 25% de sustitución de la HP; PP50: 50 de sustitución de la HP; PP75: 75% de sustitución de la HP. Valores representados como medias ± error estándar. (n=3). Los parámetros de crecimiento se basan en mediciones de los peces desde la semana 0 hasta el final del experimento. Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (p<0,05).

4.2 Efecto del pienso en la actividad enzimática

4.2.1 Actividad total de la proteasa alcalina (TAP)

En la **Figura 6** se observa que la actividad de proteasa alcalina total (TAP) resultó mayor en los peces alimentados con el pienso PP50 (2016,75 u/g proteína), y sin presentar diferencias significativas con el pienso donde se sustituyó el 25% de la HP (PP25). En cambio, sí que se observaron diferencias significativas entre el pienso PP50 y los piensos PP75 y CTRL (1840,84 y 1866,31 u/g proteína, respectivamente).

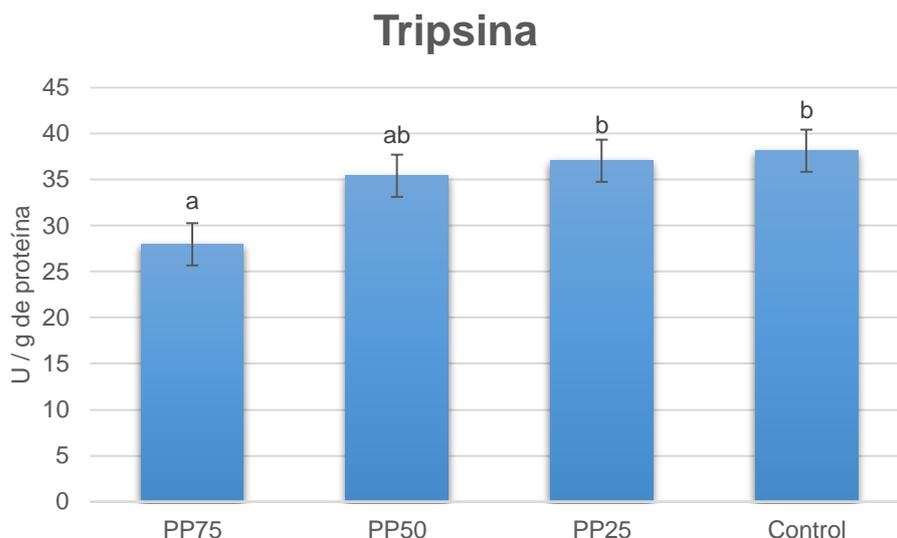


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. (n=3). Test Tukey HSD, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 6: Actividad de la proteasa alcalina total (TAP) según el pienso suministrado

4.2.2 Tripsina

En la **Figura 7** se muestra la actividad de la tripsina para los diferentes tratamientos. Los peces alimentados con el pienso CTRL presentaron una mayor actividad de la tripsina (38,14 u/g proteína) que los alimentados con el pienso PP75 (27,97 u/g proteína), aunque sin diferencias con los piensos PP25 y PP50.

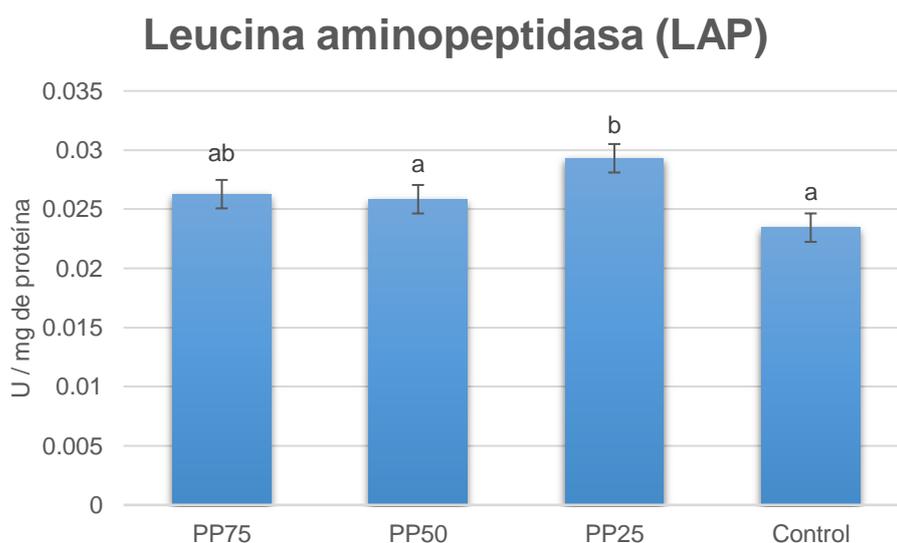


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. (n=3). Test Tukey HSD, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 7: Actividad de la tripsina según el pienso suministrado

4.2.3 Leucina Aminopeptidasa (LAP)

En la **Figura 8** se puede observar que la actividad de leucina aminopeptidasa, también presentó diferencias estadísticas entre los piensos con los que se alimentaron a los peces lumpo. Los peces alimentados con el pienso PP25 presentaron una mayor actividad de la enzima (0,029 u/mg proteína) que los alimentados con los piensos CTRL (0,023 u/mg proteína) y PP50 (0,025 u/mg proteína), sin diferencias estadísticas con los peces alimentados con el pienso PP75.

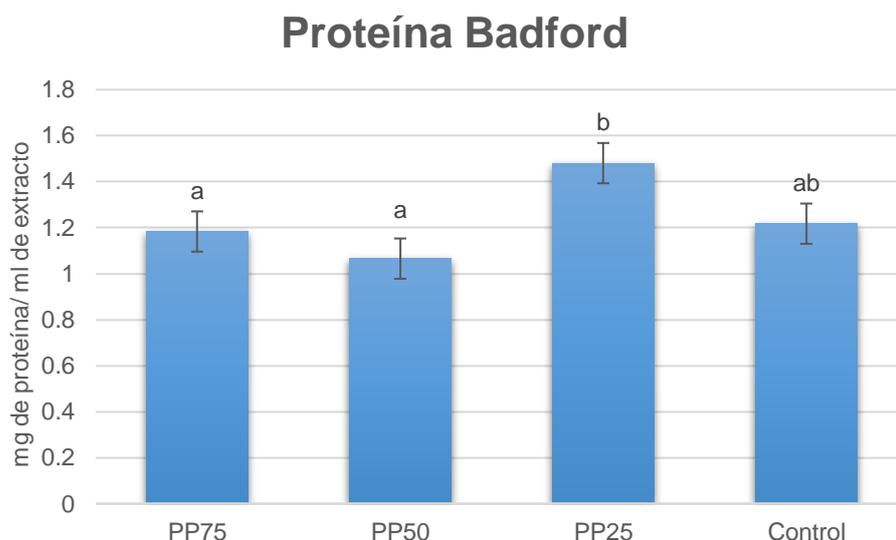


Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. (n=3). Test Tukey HSD, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 8: Actividad de la enzima leucina aminopeptidasa según el pienso suministrado

4.2.4 Proteína Bradford

En la **Figura 9** se muestra la proteína Bradford, para cada uno de los tratamientos, la cual muestra el contenido de proteína de los extractos analizados. La proteína Bradford, resultó más elevado en los extractos de los intestinos de los peces alimentados con el pienso PP25 (1,48 mg proteína/ml extracto), que en los alimentados con los piensos PP50 y PP75 (1,06 y 1,18 mg proteína/ml extracto, respectivamente).



Letras distintas en las barras indican diferencias estadísticas entre las medias. (n=5). Test Tukey HSD, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 9: Actividad enzimática de la proteína Bradford según el pienso suministrado

4.3 Actividad enzimática por sección

En la **Tabla 4** se presentan los resultados de las diferentes actividades enzimáticas analizadas para cada sección del tejido intestinal; ciegos pilóricos (CC), intestino anterior (IA), medio (IM) y distal (ID). Se puede observar que la actividad de la tripsina fue significativamente mayor en la sección IM (47,11 u/g proteína) respecto a las otras secciones, presentando la menor actividad en CC (25,27 u/g proteína), seguido del IA (28,78 u/g proteína). La actividad enzimática de la TAP fue significativamente mayor en ID (2282,37 u/g proteína) en comparación con IM (0,031 u/g proteína), IA (1855,52 u/g proteína) y CC (1604,42 u/g proteína). Aunque también se presentaron diferencias entre CC respecto IA y IM. Por otro lado, en la actividad de la LAP, se observa la misma tendencia que con la actividad de la tripsina. En la proteína Bradford sólo se observan diferencias significativas entre CC (1,43 mg proteína/ml extracto) y IM (1,10 mg proteína/ml extracto).

Tabla 4: Actividad enzimática de la tripsina, LAP, TAP y proteína Bradford en las diferentes secciones

Actividad enzimática	Sección			
	CC	IA	IM	ID
Tripsina	25,27 ± 2,193 ^a	28,78 ± 2,193 ^a	47,11 ± 2,193 ^c	37,42 ± 2,193 ^b
LAP	0,020 ± 0,0009 ^a	0,025 ± 0,0009 ^b	0,031 ± 0,0009 ^c	0,028 ± 0,0009 ^{bc}
TAP	1604,42 ± 42,583 ^a	1855,52 ± 42,583 ^b	1973,89 ± 42,583 ^b	2282,37 ± 42,583 ^c
Proteína Bradford	1,43 ± 0,074 ^b	1,24 ± 0,074 ^{ab}	1,10 ± 0,074 ^a	1,16 ± 0,074 ^{ab}

Los valores representan la media ± error del intervalo LSD(n=5). Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre las diferentes secciones de cada actividad enzimática. Test Tukey HSD, intervalo para la prueba de múltiples rangos con un intervalo de confianza del 95%.

5 DISCUSIÓN

En este experimento se evaluó el efecto del nivel de sustitución de harina de pescado por concentrado proteico de soja y guisante sobre el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas del pez lumpo. La producción de estas enzimas digestivas se ven afectadas por una serie de factores como son los hábitos de alimentación y la composición del pienso suministrado a una especie.

Dado que el pez lumpo se produce principalmente para comerse los piojos del mar del salmón atlántico, es imprescindible alimentarlo con piensos económicos, por lo que deben contener la mínima cantidad posible de HP, pues se trata de un ingrediente muy limitado y su precio es cada vez más elevado. Para lograr un despiojado óptimo, el pez lumpo ha de mantener un crecimiento uniforme, de lento a moderado, ya que los peces más grandes, están menos interesados por los piojos (Imsland *et al.*, 2014a). En este experimento se ha alimentado al pez lumpo con 4 piensos diferentes; con un 25%, 50% y 75% de sustitución de HP por CPS y CPG, determinando que un pienso con el 50% de sustitución de HP no afectó negativamente al crecimiento del lumpo, incluso se obtuvo un mayor crecimiento, posiblemente debido al hecho de que se trata de una especie omnívora. En la mayoría de las especies carnívoras y omnívoras, se pueden usar piensos con altas sustituciones de harina de pescado por mezclas vegetales sin afectar al crecimiento (Kissil y Lupatsch, 2004; Benedito *et al.*, 2008; Terova *et al.*, 2013), pero dependiendo de las materias primas vegetales y de la especie objeto de estudio, éstas pueden tener componentes no digeribles (polisacáridos distintos del almidón) (Morris *et al.*, 2005) y factores antinutricionales (inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas, alérgenos) (Francis *et al.*, 2001). Estos compuestos pueden afectar la digestibilidad, a la actividad enzimática a nivel digestivo (Rodiles *et al.*, 2012) y absorción de nutrientes (Santigosa *et al.*, 2011), así como la integridad intestinal (Sitjà *et al.*, 2005; Dimitroglou *et al.*, 2010), por ello es importante conocer el efecto de nuevos ingredientes en la actividad enzimática digestiva de la especie objeto de estudio.

Puesto que todos los peces se alimentaron hasta la saciedad, el menor incremento del peso de los peces alimentados con el pienso PP75 fue debido a la menor utilización de nutrientes proporcionados o a una peor utilización de los mismos (Willora *et al.*, 2020). Los peces alimentados con el pienso PP50 crecieron más en comparación con los peces alimentados con los otros piensos, mientras que los peces alimentados con el pienso PP75, que contenían el mayor porcentaje de CPS y CPG, fueron los que menos crecieron.

Como se ha comentado anteriormente, las harinas vegetales contienen ANT que pueden provocar efectos negativos en los peces, es decir, pueden producir una disminución del crecimiento y de la actividad enzimática, entre otros. Como se puede ver en los resultados del presente estudio, los peces alimentados con el pienso con el 75% de HP por CPS y CPG, presentaron una actividad total de la proteasa alcalina (TAP) más reducida que el resto, lo que podría deberse a los inhibidores de proteasas que contiene la soja y que reducen la hidrólisis enzimática de las proteínas, afectando negativamente a la tasa de crecimiento de los peces. De la misma manera se observó en la actividad de la tripsina que los peces alimentados con el pienso PP75 se vieron más afectados su actividad. Aunque se ha estudiado que con tratamientos térmicos pueden eliminarse estos inhibidores, (Dawson & Houlihan, 1998) concluyeron que los tratamientos tecnológicos no siempre garantizan la eliminación completa de los inhibidores de la tripsina que afectan a las proteasas digestivas de los peces. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos en previos experimentos (Mongol *et al.*, 2016) con peces alimentados con altas cantidades de proteínas vegetales, donde la actividad de la tripsina disminuye considerablemente, y, por lo tanto, reduce también la actividad del resto de enzimas que se segregan como zimógenos al tubo digestivos y deben ser activadas por la tripsina, dando como resultado una disminución general de la actividad proteolítica (TAP) total a nivel intestinal.

Respecto a la Leucina aminopeptidasa (LAP) es una enzima del borde del cepillo intestinal o dentro de los enterocitos que no se segrega como zimógeno y se encarga de completar la rotura de los péptidos hasta los monómeros. En previos experimentos (Cahu & Zambonino-Infante, 1997) observaron que la secreción de estas enzimas está relacionada al tipo de alimento ingerido, siendo en el presente experimento mayor en los peces alimentados con el pienso PP25 donde tiene lugar su mayor actividad, lo que concuerda con los buenos resultados de crecimiento de los peces alimentados con este pienso.

En relación con la actividad enzimática respecto a la sección intestinal, esto depende de las especies. En el caso del lumpo, la mayor actividad de tripsina y de LAP se encontró en el intestino medio (IM). En general, las enzimas digestivas, como la tripsina que se sintetizan en el páncreas exocrino se secretan en el intestino anterior (IA) (Bakke *et al.*, 2010), por lo tanto, IA es el principal sitio donde se lleva a cabo la digestión y la absorción de los nutrientes. En la carpa común la sección IM es donde se realiza la hidrólisis enzimática de proteína y almidón, así como la absorción de los aminoácidos (Dabrowski, 1986). Es por ello, que el lumpo por su carácter omnívoro presente un patrón de digestión más similar a la carpa que al salmón atlántico, que es una especie carnívora. En cuando a la actividad de las proteasas alcalinas totales (TAP) fue bastante más mayor en la sección ID que en las otras secciones. Las proteasas intestinales tienden a ser más bajas en el ID respecto a las otras secciones más anteriores (Krogdahl *et al.*, 2015). No obstante, las discrepancias con el presente estudio pueden ser porque en este caso se consideran todas las actividades de proteasas, y no solo las que se segregan por vía pancreática, sino también las que se segregan en el borde el cepillo intestinal y/o están dentro de los enterocitos, como por ejemplo las enzimas aminopeptidasa. Comparando todos los tejidos analizados en este estudio, las actividades enzimáticas específicas fueron menores en CC en comparación con las otras secciones intestinales, en cambio, en el estudio (Gai *et al.*, 2012), muestra que para truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) la TAP fue mayor en la región de CC en comparación con las otras regiones, al igual que en los salmónidos la CC constituye una mayor porción del intestino respecto a las otras regiones. Los peces lumpo tienen una masa de tejido de CC relativamente menor comparado con otras especies como la dorada, pero están presentes con mayor número (Tian *et al.*, 2018). En el estudio (Olli *et al.*, 2018) observó una disminución de tripsina en IA y IM en doradas alimentadas con HS. De manera similar (Rodiles *et al.*, 2012) observó que los niveles de TRP fueron significativamente menores en el ID para el lenguado senegalés (*Solea Senegalensis*) alimentados con el 28% de CPG ya que podría estar relacionado con la presencia de inhibidores de proteasas. Alarcón *et al.* (2001) explicó que los efectos inhibidores de la harina de semilla de guisante reducen la actividad proteasa alcalina debido a la presencia de inhibidores de proteasas estables al ácido y/o al calor que son capaces de reaccionar con enzimas similares a la tripsina. En contraste con los anteriores resultados, en este estudio no se encontró ningún cambio de TRP relacionado con el pienso.

6 CONCLUSIONES

En este estudio del pez lumpo alimentado con diferentes piensos con distintos niveles de inclusión de concentrado de proteína soja (CPS) y proteína de guisante (CPG), podemos concluir que:

La sustitución de la harina de pescado por una mezcla del 50% de CPS y CPG no afectó negativamente al crecimiento del pez, mientras que la sustitución del 75% de esta mezcla, sí afectó negativamente al crecimiento.

La actividad de la tripsina disminuyó conforme se iba incluyendo más cantidad de mezcla de estas harinas vegetales, es decir, el pienso PP75 tuvo la actividad más baja en comparación con el pienso control.

La actividad de leucina aminopeptidasa (LAP) fue menor en el pienso control respecto al pienso PP25, los otros dos piensos tuvieron valores muy similares.

La actividad de las proteasas alcalinas totales (TAP) fue mayor en el pienso con una sustitución de harina de pescado del 50%, mientras que en el pienso con una sustitución del 75% fue mucho menor, debido posiblemente a la presencia de inhibidores de proteasas.

La actividad de tripsina y de LAP fue mayor en el IM, en cambio, la actividad de TAP fue significativamente mayor en el ID respecto a las otras secciones.

En general, el pez lumpo puede digerir bien los piensos vegetales con una sustitución del 50%, ya que no se observaron efectos negativos ni en el crecimiento ni en la digestión enzimática. En cambio, una sustitución del 75% no es recomendable porque sí afectó negativamente, tanto en el crecimiento, como en la digestión del pez.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, F. J., Díaz, M., Moyano, F. J., & Abellán, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(3), 257–267. <https://doi.org/10.1023/A:1007717708491>
- Alarcón FJ, García-Carreño FL, Navarrete del Toro MA (2001). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiol Biochem* 24:179–181
- Arriaga-Hernández, D., Hernández, C., Martínez-Montaña, E., Ibarra-Castro, L., Lizárraga-Velázquez, E., Leyva-López, N., & Chávez-Sánchez, M. C. (2021). Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for white snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture*, 530, 735823. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735823>
- Bakke, A. M., Glover, C. & Krogdahl, Å. 2010a. 2 - Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: Grosell, M., Farrell, A. P. & Brauner, C. J. (eds.) *Fish Physiology*. Academic Press.
- Bell, J. G., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2003). Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): Changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out.” *Aquaculture*, 218(1–4), 515–528. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00462-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00462-3)
- Benedito-Palos L, Navarro JC, Sitjà-Bobadilla A, Gordon Bell J, Kaushik S, Pérez-Sánchez J (2008). High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br J Nutr* 100: 992–1003 pmid:18377678
- Bergheim, Asbjørn. (2012). Recent growth trends and challenges in the Norwegian aquaculture industry. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 40. 800 - 807.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cahu, C.L & Zambonino – Infante, J.L (1997). Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Int.* 5, 151-160.
- Dabrowski, K. 1986. Physiological and nutritional aspects of intensive feeding of carp
- Dawson M.A.I. and Houlihan D.F. (1993) Trypsin inhibitors in commercial fish food. In *Fish Nutrition in Practice*. Kaushik, S.J. and Luquet, P. (Eds.). *Coiloques No. 61*: 220-222. Biarritz, France.

- Dimitroglou A., Merrifield DL, Spring P, Sweetman J, Moate R, Davies SL (2010). Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* (300: 182–188).
- FAO (2002). Fish roes in Europe, supply and demand conditions.
- Francis, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. In *Aquaculture* (Vol. 199, Issues 3–4, pp. 197–227). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gai, F., Gasco, L., Daprà, F., Palmegiano, G. B., & Sicuro, B. (2012). Enzymatic and Histological Evaluations of Gut and Liver in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed with Rice Protein Concentrate-based Diets. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(2), 218–229. <https://doi.org/10.1111/J.1749-7345.2012.00557.X>
- Grant, George. (1991). Lectins. *Scientific American*, 236(6), 108–116, 118. <https://doi.org/10.1533/9781845698454.49>
- Grasso, V. (2006). *IV MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA*.
- Hendriks, H. G. C. J. M., van den Ingh, T. S. G. A. M., Kroghdahl, Å., Olli, J., & Koninkx, J. F. J. G. (1990). Binding of soybean agglutinin to small intestinal brush border membranes and brush border membrane enzyme activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 91(1–2), 163–170. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90185-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90185-P)
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Foss, A., Vikingstad, E., & Elvegård, T. A. (2014). The use of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) to control sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestations in intensively farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 424–425, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.033>
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Nytrø, A. V., Foss, A., Vikingstad, E., & Elvegård, T. A. (2014a). Assessment of growth and sea lice infection levels in Atlantic salmon stocked in small-scale cages with lumpfish. *Aquaculture*, 433, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.008>
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Hangstad, T. A., Jónsdóttir, Ó. D. B., Noble, T., Wilson, M., Mackie, J. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., & Mikalsen, B. (2018). Feeding behaviour and growth of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) fed with feed blocks. *Aquaculture Research*, 49(5), 2006–2012. <https://doi.org/10.1111/are.13657>
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Nytrø, A. v., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Jónsdóttir, Ó. D. B., Emaus, P. A., Elvegård, T. A., Lemmens, S. C. A., Rydland, R., & Jonassen, T. M. (2016). Effects of lumpfish size on foraging behaviour and co-existence with sea lice infected Atlantic salmon in sea cages. *Aquaculture*, 465, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.015>

- Imslund, A. K., Reynolds, P., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., & Mikalsen, B. (2018). Effects of three commercial diets on growth, cataract development and histopathology of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture Research*, 49(9), 3131–3141. <https://doi.org/10.1111/are.13776>
- Imslund, A. K., Reynolds, P., P., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., Hanssen, A., & Mikalsen, B. (2019). Effects of different feeding frequencies on growth, cataract development and histopathology of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture*, 501, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.026>
- Imslund, A. K., Reynolds, P., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Adron, J., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., Hanssen, A., & Mikalsen, B. (2019). Comparison of diet composition, feeding, growth and health of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) fed either feed blocks or pelleted commercial feed. *Aquaculture Research*, 50(7), 1952–1963. <https://doi.org/10.1111/are.14083>
- Kalhor, H., Zhou, J., Hua, Y., Ng, W. K., Ye, L., Zhang, J., & Shao, Q. (2018). Soy protein concentrate as a substitute for fish meal in diets for juvenile *Acanthopagrus schlegelii*: effects on growth, phosphorus discharge and digestive enzyme activity. *Aquaculture Research*, 49(5), 1896–1906. <https://doi.org/10.1111/are.13645>
- Kissil G.W. & Lupatsch I. (2004) Successful replacement of fishmeal by plant proteins in diets for the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Israeli Journal of Aquaculture* 56, 188– 199. Klinkhardt, (2002a). Kaviar and lachs, forelle and seehase. Kaviar and kaviarartige. Producte, Folge 4. *Fisch Magazine*, 6: 52 - 57
- Krishnan, H. B., & Jez, J. M. (2018). Review: The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. In *Plant Science* (Vol. 272, pp. 14–21). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.030>
- Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M. & Bakke, A. M. 2015a. Soya Saponins Induce Enteritis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), pp 3887-3902 DOI: 10.1021/jf506242t
- Mambrini, M., Roem, A. J., Cravèdi, J. P., Lallès, J. P., & Kaushik, S. J. (1999). Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal Science*, 77(11), 2990–2999. <https://doi.org/10.2527/1999.77112990x>
- Martínez-Llorens, S., Peruzzi, S., Falk-Petersen, I. B., Godoy-Olmos, S., Ulleberg, L. O., Tomás-Vidal, A., Puvanendran, V., Odei, D. K., Hagen, Ø., Fernandes, J. M. O., & Jobling, M. (2021). Digestive tract morphology and enzyme activities of juvenile diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fishmeal-based diets with or without fish protein

hydrolysates. *PLoS ONE*, 16(1 January), e0245216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245216>

- Menoyo, D., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Ginés, R., Lopez-Bote, C. J., & Bautista, J. M. (2004). Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *British Journal of Nutrition*, 92(1), 41–52. <https://doi.org/10.1079/bjn20041165>
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J., & Izquierdo, M. S. (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Effects on fish health. *Aquaculture*, 225(1–4), 353–370. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00301-6)
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Ginés, R., & Izquierdo, M. S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248(1–4), 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.003>
- Morris PC, Gallimore P, Handley J, Hide G, Haughton P, Black A. (2005). Full-fat soya for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater: Effects on performance, composition and flesh fatty acid profile in absence of hind-gut enteritis. *Aquaculture* 248: 147–161
- Mourente, G., Good, J. E., & Bell, J. G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, 11(1), 25–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00320.x>
- Murashita K, Fukada H, Takahashi N, Hosomi N, Matsunari H, Furuita H, Oku H, Yamamoto T (2015) Effect of feed ingredients on digestive enzyme secretion in fish. *Bull Fish Res Agen* 40:69–74
- Murashita, K., Matsunari, H., Furuita, H., Rønnestad, I., Oku, H., & Yamamoto, T. (2018). Effects of dietary soybean meal on the digestive physiology of red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 493, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.005>
- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., & Chong, A. (2004). Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, 233(1–4), 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.012>
- Norton, G. (1991). Proteinase Inhibitors. In *Toxic Substances in Crop Plants* (pp. 68–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845698454.68>
- Norwegian Directorate of Fisheries, 2020. Sale of farmed cleaner fish 2012-2019 (10 mayo de 2020) <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk>

- Olli, J. J., Hjelmeland, K. & Krogdahl, Å. 1994. Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(4), pp 923-928 DOI: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90240-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90240-2).
- 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*).
- Pervin, Mst. A., Jahan, H., Akter, R., Omri, A., & Hossain, Z. (2020). Appraisal of different levels of soybean meal in diets on growth, digestive enzyme activity, antioxidation, and gut histology of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 2020 46:4, 46(4), 1397–1407. <https://doi.org/10.1007/S10695-020-00798-5>
- Powell, A., Treasurer, J. W., Pooley, C. L., Keay, A. J., Lloyd, R., Imsland, A. K., & Garcia de Leaniz, C. (2018). Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 683–702. <https://doi.org/10.1111/raq.12194>
- Rahmah, S., Aliyu-Paiko, M., & Hashim, R. (2016). In vivo and in vitro protein digestibility in juvenile bagrid catfish *Mystus nemurus* (Cuvier and Valenciennes 1840) fed soybean meal-based diets. *Aquaculture Research*, 47(5), 1392–1401. <https://doi.org/10.1111/are.12595>
- Raquel Monge-Ortiz, Silvia Martínez-Llorens, Lorenzo Márquez, Francisco Javier Moyano, Miguel Jover-Cerdá & Ana Tomás-Vidal (2016). Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Archives of Animal Nutrition*, 70:2, 155-172, DOI: [10.1080/1745039X.2016.1141743](https://doi.org/10.1080/1745039X.2016.1141743)
- Refstie, S., Korsøen, Ø. J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., & Roem, A. J. (2000). Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 190(1–2), 49–63. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00382-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00382-3)
- 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.
- Rodiles, A., Santigosa, E., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I.(2012). Effect of dietary protein level and source on digestive proteolytic enzyme activity in juvenile Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup 1850. *Aquacult Int* 20, 1053–1070 <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9508-6>
- Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentin, J.M., Pérez-Sanchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Gallardo, M.A (2011). Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture* 317: 146–154

- Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. (2005) Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249: 387–400.
- Terova G, Robaina L, Izquierdo M, Cattaneo A, Molinari S, Bernardini G et al. PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *Springerplus* 2013; 2:19
- Tian, J., Wang, K., Wang, X., Wen, H., Zhou, H., Liu, C., Mai, K. & He, G. 2018. Soybean saponin modulates nutrient sensing pathways and metabolism in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 257(246-254 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.10.010>.
- Voorhees, J. M., Barnes, M. E., Chipps, S. R., & Brown, M. L. (2019). Bioprocessed soybean meal replacement of fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1579482. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1579482>
- Willora, F. P., Nadanasabesan, N., Knutsen, H. R., Liu, C., Sørensen, M., & Hagen, Ø. (2020). Growth performance, fast muscle development and chemical composition of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) fed diets incorporating soy and pea protein concentrates. *Aquaculture Reports*, 17, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100352>
- Zhang, C., Rahimnejad, S., Wang, Y. ru, Lu, K., Song, K., Wang, L., & Mai, K. (2018). Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 483, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.029>
- Zhang, Y., Øverland, M., Shearer, K. D., Sørensen, M., Mydland, L. T., & Storebakken, T. (2012). Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *Aquaculture*, 360–361, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.003>
- ZAMORA, S.; RUBIO, V.C. (2009). La digestión en los peces, en: La nutrición y la alimentación en piscicultura. Ed. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de acuicultura. Madrid: 15-46.