UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Evaluación nutricional del lupino blanco (*Lupinus albus*) como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile.

ALIRO SAMUEL BORQUEZ RAMIREZ

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
2008

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Evaluación nutricional del lupino blanco (*Lupinus albus*) como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile.

Memoria que presenta el licenciado ALIRO SAMUEL BORQUEZ RAMIREZ, para la colación del grado de Doctor en Ciencias del Mar en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

Las Palmas de Gran Canaria, enero de 2008

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

LIDIA ESTHER ROBAINA ROBAINA, Doctora en Ciencia del Mar, investigadora del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, hace constar que la presente memoria "Evaluación nutricional del lupino blanco (*Lupinus albus*) como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile", de la cual es autor el licenciado en Ciencias del Mar, Aliro Samuel Bórquez Ramírez, ha sido realizada bajo su dirección, siendo así misma revisada y aceptada para la colación del grado de Doctor en Ciencias del Mar de La Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Las Palmas de Gran Canaria, enero de 2008.

Dra. Lidia E. Robaina Robaina

Investigadora

ÍNDICE

Agradecimientos I

Índice de figuras II

Índice de tablas IV

RESUMEN VII

CAPITULO I 1

1. INTRODUCCION GENERAL 2

1.1. Nutrición y calidad 3

1.2. Harina y aceite de pescado, problemática actual 9

1.3. Fuente de proteínas alternativas para la acuicultura 15

1.4. El lupino como ingrediente proteico alternativo en piensos de peces 27

1.5. Utilización proteica y lipídica en peces y su relación con materias primas vegetales 40

1.6. Estado actual de la salmonicultura y la industria de alimentos en Chile 47

1.7. Proyección y contribución del estudio 53

1.8. Objetivos 54

CAPITULO II 55

2 MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES 56

2.1 Experimentos de digestibilidad 56

2.1.1 Estanques de cultivo 56

2.1.2 Incorporación de marcador inerte 57

2.1.3 Digestibilidad de la materia prima 58

2.1.4 Alimentación y colección de heces 59

2.1.5 Ecuaciones para el cálculo de la digestibilidad 60

2.2 Experimentos de crecimiento 61

2.1.1 Condiciones de cultivo 61

2.2.2 Parámetros productivos evaluados 62

2.2.3 Parámetros fisiológicos evaluados 63

2.3 Análisis químicos 64

2.2.1 Análisis proximales 64

2.2.2 Análisis de cromo 65

2.2.3 Análisis de aminoácidos 66

2.3.4 Análisis de ácidos grasos 66

2.3.5 Análisis energético 67

2.3.6 Análisis de carcasa 68

2.3.7 Análisis de fósforo 68

2.4 Tratamientos estadísticos 68

CAPITULO III 69
3 EXPERIMENTO 1. DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA PRIMA 70
3.1 Introducción 70
3.2 Material y métodos 75
3.2.1 Ingredientes y preparación de dietas 75
3.2.2 Condiciones experimentales y recolección de heces 77
3.2.3 Análisis estadísticos 77
3.3 Resultados 79
3.4 Discusión 94
3.4.1 Digestibilidad de las dietas 95
3.4.2 Digestibilidad de los ingredientes 98

CAPITULO IV 109
4 EXPERIMENTO 2. EVALUACIÓN DE DIETAS CON BAJOS NIVELES DE LUPINO 110
4.2 Material y métodos 112
4.2.1 Dietas 112
4.2.2 Estudio de crecimiento 113
4.2.3 Estudio de digestibilidad aparente (CDA) 116
4.2.4 Mediciones zootécnicas 116
4.2.5 Análisis químicos 117
4.2.6 Análisis histológicos 117
4.2.7 Análisis estadísticos 118
4.3 Resultados 118
4.3.1 Crecimiento y rendimientos productivos 118
4.3.2 Composición corporal de los peces 120
4.3.3 Estudio histológico 121
4.3.4 Coeficiente de digestibilidad aparente de las dietas 124
4.3.5 Composición de ácidos grasos en el músculo 124
4.4 Discusión 130

CAPITULO V 137
5 EXPERIMENTO 3. EVALUACIÓN DE DIETAS CON ALTOS NIVELES DE LUPINO 138
5.1 Introducción 138
5.2 Material y métodos 140
5.2.1 Dietas 140
5.2.2 Estudio de crecimiento 144

5.2.3 Estudio de digestibilidad aparente (CDA) 145
5.2.4 Mediciones zootécnicas 145
5.2.5 Análisis químicos 145
5.2.6 Análisis histológicos 146
5.2.7 Análisis estadísticos 146
5.3 Resultados 146
5.3.1 Crecimiento y rendimientos productivos 146
5.3.2 Composición corporal de los peces 148
5.3.3 Estudio histológico 149
5.3.4 Coeficiente de digestibilidad aparente de las dietas 150
5.3.5 Composición de ácidos grasos en el músculo 153
5.4 Discusión 159

CAPITULO VI 171
6 CONCLUSIONES 171

CAPITULO VII 175
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 175

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la oportunidad de poder alcanzar este objetivo y a mi familia por el apoyo constante y por la paciencia frente a muchas privaciones de afectos.

A la empresa Biomar-Chile S.A. por la fabricación de las dietas, en especial a Jaime Carrasco, R&D Biomar-Chile por el apoyo constante y desinteresado.

A mis alumnos memoristas, al personal de la escuela de acuicultura, en especial al grupo de nutrición, por la ayuda siempre dispuesta para el seguimiento de los ensayos. También a las analistas químicas, por la disposición para realizar los múltiples análisis y repeticiones solicitadas.

Al grupo de investigación en acuicultura, de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, por los conocimientos entregados y por las facilidades entregadas para la realización de esta tesis. En especial a mi profesora tutora, por la paciencia de esperar todo este tiempo y por la dedicación en la revisión del manuscrito.

Finalmente agradezco a mi Universidad y a sus autoridades que me han dado los espacios, el tiempo y la comprensión para poder terminar este trabajo.

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Uso actual de la harina de pescado y su proyección al 2010. (Fuente: IFFO 2006). Pág. 11

Figura 2. Producción mundial de harina de pescado según país y año (Fuente: IFFO 2006). Pág. 11

Figura 3. Producción mundial de aceite de pescado según país y año (Fuente: IFFO 2006). Pág. 12

Figura 4. Producción Total, Importaciones y Exportaciones de Harina de Pecado y Aceite de pescado en Chile, incluida la producción de peces de cultivo. Pág. 15

Figura 5. Muestra las tres especies de género Lupinus, que son explotadas comercialmente. A: *Lupinus albus*, B: *Lupinus luteos* y C: *Lupinus angustifolius*. Pág. 27

Figura 6. Distribución de la superficie mundial dedica al cultivo de lupino (DGI, 2001). Pág. 28

Figura 7. Evolución de la superficie sembrada y producción Lupino en Chile. Periodo 1999/00 a 2006/07. ² Cifras provisorias. Fuente: ODEPA con información de INE, IANSA, industrias aceiteras y CCT. Pág. 30

Figura 8. Evolución de la producción de salmónidos de los diez principales productores mundiales. 48

Figura 9. Evolución de la producción mundial de salmónidos silvestres y de cultivo. Fuente: SalmónChile, 2007. Pág. 49

Figura 10. Exportaciones de salmón y trucha chilenas según destino, valores en miles de dólares. Fuente: SalmónChile, 2007. Pág. 50

CAPÍTULO II

Figura 1. Estanques utilizados en los bioensayos de digestibilidad. Tanto para evaluar las materias primas como las dietas experimentales. Pág. 56

Figura 2. Alimento con incorporación de 1% de óxido de cromo (Cr_2O_3). Pág. 57

Figura 3. Estanques de 500 litros utilizados para el bioensayo de crecimiento en la Piscicultura los Laureles. Pág. 60

CAPÍTULO III

Figura 1. Digestibilidad aparente en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* alimentadas con dietas con 30% de inclusión de harina de *Lupinus albus* sometida a diferentes tratamientos de calor, **(a)** CDA de total, **(b)** CDA de proteína, **(c)** CDA de extracto etéreo, **(d)** CDA de los hidratos de carbono, **(e)** CDA de la energía y **(f)** CDA del fósforo. Pág. 85

Figura 2. Digestibilidad aparente en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* de la harina de lupino (*Lupinus albus)* sometida a diferentes tratamientos con calor, **(a)** CDA de total, **(b)** CDA de proteína, **(c)** CDA de extracto etéreo, **(d)** CDA de los hidratos de carbono, **(e)** CDA de la energía y **(f)** CDA del fósforo. Pág. 93

Figura 1a. Tejido hepático de los peces previos a la aplicación de los tratamientos. Aumento 40X. Pág. 121

Figura 1b. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L00. Aumento 40X. Pág. 122

Figura 1c. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L10. Aumento 40X. Pág. 122

Figura 1d. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L15. Aumento 40X. Pág. 123

Figura 1e. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L20. Aumento 40X. Pág. 123

Figura 2. Concentración total de ácidos grasos saturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 126

Figura 3. Concentración total de ácidos grasos mono-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 126

Figura 4. Concentración total de ácidos grasos poli-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 128

Figura 5. Concentración de algunos ácidos grasos en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 129

Figura 1. Tejido digestivo de los peces previo y posterior a la aplicación de los tratamientos. Para cada tratamiento se muestra dos microfotografías que corresponden a peces diferentes. Aumento 40X. Pág. 152

Figura 2. Tejido hepático de los peces previo y posterior a la aplicación de los tratamientos. Para cada tratamiento se muestra dos microfotografías que corresponden a peces diferentes. Aumento 40X. Pág. 153

Figura 3. Concentración total de ácidos grasos saturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 154

Figura 4. Concentración total de ácidos grasos mono-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 156

Figura 5. Concentración total de ácidos grasos poli-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 157

Figura 6. Concentración de algunos ácidos grasos en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. Pág. 159

INDICE DE TABLAS

CÁPITULO I

Tabla 1. Total de captura de especies pelágicas usada para fabricación de harina de pescado en Chile (Fuente, Sernapesca, 2007). Pág. 14

Tabla. 2 Composición proximal y digestibilidad aparente de las principales materias primas vegetales utilizadas en piensos para la acuicultura comparadas con harina de pescado. Los datos corresponden a materias primas sin ningún tratamiento, excepto la molienda. Modificado de DFWA, 2001. Pág. 25

Tabla. 3 Composición proximal y digestibilidad de las principales materias primas vegetales utilizadas en piensos para la acuicultura comparadas con harina de pescado. Los datos corresponden a materias primas a las cuales se les aplicó algún tratamiento tecnológico. Pág. 26

Table 4. Composición química de los principales productos de lupino en comparación con la harina de pescado y la harina de soja (todos los valores se expresan en g/Kg de MS a menos que este especificado de otra forma). Pág. 33

Tabla 5. Composición proximal de las semillas de Lupino cultivadas en Chile. Pág. 32

Tabla 6. Composición de aminoácidos (g/100g) de las especies de lupino cultivadas en Chile. Pág. 34

Tabla 7. Composición de ácidos grasos de las especies de lupino cultivadas en Chile. Pág. 35

Tabla 8. Principales factores antinutricionales en lupino comparado con otras materias primas proteicas vegetales. Pág. 37

Tabla 9. Digestibilidad de harinas de lupino comparada con soja y gluten de trigo en *O. mykiss* y *S. auratus* (Glencross y Hawkins, 2004). Pág. 39

Tabla 10. Parámetros relacionados al consumo de proteína para crecimiento de peces y otros vertebrados. Pág. 43

CÁPITULO II

Tabla 1. Formulación de dieta de referencia utilizada en la evaluación de la digestibilidad de una materia prima. Pág. 58

CÁPITULO III

Tabla 1. Composición de nutrientes de los ingredientes experimentales, todos los valores se expresan porcentaje (%) excepto los indicados. Pág. 75

Tabla 2. Formulaciones y composición de nutrientes de las dietas experimentales, todos los valores se expresan porcentaje (%) excepto los indicados. La composición proximal de las dietas se entrega en porcentaje de base seca. Pág. 77

Tabla 3. Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* alimentadas con dietas con inclusión de 30% de harina de lupino sometida a diferentes tratamientos térmicos. Pág. 80

Tabla 4. Parámetros estadísticos de la ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias en respuesta del CDA por especie y para las dietas con inclusión de 30% de *Lupino albus* sometido a diferentes tratamientos térmicos. Pág. 81

Tabla 5. Comparación de medias mediante el test de Tukey. La especie como efecto principal en la evaluación de los CDA de dietas con inclusión de 30% de *Lupinus albus* sometido a diferentes tratamientos térmicos. Pág. 81

Tabla 6. Comparación de medias mediante el test de Tukey. Se confronta las respuestas medias de CDA en *O. mykiss* y *S. salar* en forma conjunta para las siete dietas evaluadas. Pág. 82

Tabla 7. Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) harina de lupino, *Lupinus albus*, sometida a diferentes tratamientos térmicos en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* alimentadas. Pág. 87

Tabla 8. Parámetros estadísticos de la ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias en respuesta del CDA por especie y por tratamiento térmico aplicado a la harina de *Lupino albus*. Pág. 88

Tabla 9. Comparación de medias mediante el test de Tukey. Considerando la especie como efecto principal en la evaluación de los CDA de la materia prima en *O. mykiss* y *Salmo salar.* Pág. 89

Tabla 10. Comparación de medias mediante el test de Tukey. Consideran el tratamiento aplicado al lupino como efecto principal en la evaluación de los CDA de la materia prima en *O. mykiss* y *Salmo salar*. Pág. 89

CAPÍTULO IV

Tabla 1. Formulación y composición de las dietas experimentales. Pág. 113

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales. Pág. 115

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales. Pág. 116

Tabla 4. Crecimiento y rendimientos productivos en trucha arco iris alimentadas con las diferentes dietas experimentales. Pág. 119

Tabla 5. Composición corporal e índices hepatosomáticos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentado con diferentes dietas experimentales. Pág. 120

Tabla 6. Coeficiente de digestibilidad aparente y energía digestible para las dietas experimentales. Pág. 124

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos presentes en el músculo de trucha arco iris alimentado con las diferentes dietas experimentales. Pág. 125

CAPÍTULO V

Tabla 1. Formulación y composición de las dietas experimentales Pág. 142

Tabla 2. Aporte porcentual de proteínas de las diferentes materias primas utilizadas en la formulación. Pág. 143

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales. Los valores se expresan en g/100 de dieta. Pág. 143

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales. Los valores se expresan en g/100g de ácidos grasos detectados. Pág. 144

Tabla 5. Crecimiento y rendimientos productivos de trucha arco iris alimentadas con las diferentes dietas experimentales. Pág. 148

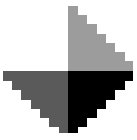
Tabla 6. Composición corporal e índice hepatosomático de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentado con diferentes dietas experimentales. Pág. 150

Tabla 7. Coeficiente de digestibilidad aparente y energía digestible para las dietas experimentales. Pág. 154

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos presentes en el músculo de trucha arco iris alimentado con las diferentes dietas experimentales. Pág. 155

RESUMEN

Las proyecciones de producción de la acuicultura planeadas al 2010 en la década del 90, probablemente se alcancen antes de esta fecha. Este hecho ha estimulado la búsqueda de nuevas fuentes proteicas y lipídicas alternativas a la harina y aceite de pescado. Las leguminosas de grano, están siendo utilizadas en reemplazo de la harina de pescado en piensos para peces. El lupino (*Lupinus spp*), también conocido como altramuz o lupini, es una de las leguminosas con mayor potencial para su uso en acuicultura. Esta tesis evalúa la utilización digestiva y la incorporación parcial de lupino (*Lupinus albus*) sometido a diversos procesos en dietas comerciales para salmónidos en Chile. Los resultados muestran que la harina de lupino cruda con y sin cáscara sometida a los diferentes procesos térmicos no presenta una alteración significativa en su composición proximal. El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) del lupino como materia prima con y sin tratamiento térmico muestra respuestas significativamente diferentes ($P<0,05$) en salmón del Atlántico y la trucha arco iris. El uso del lupino entero en dietas extruídas para trucha arco iris, independiente de su nivel de incorporación (10%, 15%, 20%, 30%, 40% y 50%), presento índices de crecimiento, conversión y sobrevivencia similares a los obtenidos por la dieta control, sin lupino. En general, la inclusión de la harina de lupino en bajos niveles (hasta 30%) no afecta en forma significativa ($P>0.05$) la composición proximal de la carcasa, la histología hepática ni la composición de ácidos grasos del músculo. Aunque no significativo la composición proximal de la carcasa y el perfil de ácidos grasos se vio ligeramente afectada con la incorporación de lupino sobre 30%. Estos resultados confirman que *Lupino albus* es un excelente ingrediente proteico y de alto potencial para su uso en la salmonicultura chilena.



CAPÍTULO I:

Introducción General

1. INTRODUCCION

El modelo desarrollado por la IFPRI[1] (Delgado *et al.*, 2003) para proyectar demanda, abastecimiento y comercio de pescado al 2020 en diversos escenarios, tales como, expansión rápida o lenta de la acuicultura, descenso de la producción China, uso más eficiente del pescado como alimento y/o colapso de las pesquerías; muestran que, el pescado continuará siendo más caro para el consumidor que otro tipo de alimentos en el 2020. Los precios del pescado para consumo, así como la harina y el aceite de pescado probablemente se elevarán bajo cualquiera de los escenarios. La acelerada expansión de la acuicultura es sólo un escenario que disminuirá el precio real del pescado, aunque podría causar una significativa elevación del precio de la harina de pescado. Los países en desarrollo aumentarán el consumo de pescado, mientras que se mantendrá más o menos estático en los países desarrollados. Aun bajo un escenario de colapso ecológico, el consumo per capita global descendería de 17,1 a 14,2 kilos, esto porque la producción se sostendrá a través de la acuicultura a precios más altos. También, habrá un rápido incremento de la producción, siempre con una creciente cuota de los países en desarrollo, las exportaciones netas de estos países continuarán hacia el 2020, aunque a un nivel más bajo que el presente.

La situación descrita anteriormente es la que se predice para la próxima década. Independiente de los escenarios que se den en el futuro, en la actualidad existe el consenso tanto del mundo científico como productivo, que la acuicultura intensiva de especies carnívoras debe mejorar la eficiencia en el uso harina y aceite de pescado a través de un rápido progreso tecnológico. En los últimos diez años la industria acuícola ha experimentado una evolución asombrosa, con un crecimiento anual que ha llegado a superar el 7 por cien

[1] International Food Policy Research Institute

anual (SOFIA, 2006). Para sostener este desarrollo se han utilizado dietas completas de alto costo (Hasan, 2001), sin embargo la sostenibilidad de la acuicultura pasa por la búsqueda e inclusión en las dietas de materias primas alternativas a la harina y aceite de pescado que puedan mantener y mejorar la calidad nutricional de dietas completas a un mínimo costo.

1.1. Nutrición y calidad

La creciente demanda de nuevas materias primas proteicas y lipídicas, producto del sostenido incremento de la producción animal y de la acuicultura intensiva en particular, ha mantenido en la discusión el tema de la calidad de los productos que se derivan al consumo humano. Para un consumidor normal de pescado tres son aspectos de calidad relevantes a la hora de adquirirlo, a saber, apariencia (forma, color), frescura y la relación de estos con la calidad o valor nutricional e inocuidad. Los aspectos de la calidad sobre los cuales puede actuar la nutrición pueden resumirse a color, sabor, estructura, textura, estabilidad, olor, apariencia de aceptabilidad, y valor nutritivo. Aquellos aspectos de la calidad que influencian nuestros sentidos son conocidos como características organolépticas de un producto.

El término calidad del pescado es muy amplio y su estudio difícil debido al hecho que parámetros específicos que son reconocidos como esenciales en una parte del mundo son considerados menos importantes en otro sitio. Más aun, existen aspectos diferentes de calidad del pescado con respecto a la satisfacción de demandas específicas de la industria. Por ejemplo, el pescado para ahumado debe contener relativamente más grasa que el pez vendido congelado (Hamre *et al.* 2004). De esta manera la demanda de calidad de los productos varía en diferentes regiones geográficas y con diferentes culturas, y requerimientos esporádicos de mercados específicos. La

percepción en términos de calidad difiere entre el productor de peces, la industria de procesado y el consumidor. Mientras que para el cultivador el crecimiento y la conversión son los parámetros más importantes, para el consumidor no tienen un interés directo. Sin embargo, la producción es lo que positivamente reciben procesadores y consumidores y naturalmente es la principal preocupación del productor de pescado. Más aún, el continuo abastecimiento y la rápida producción, son de interés para procesadores y consumidores desde la perspectiva de estabilidad de precios y satisfacción de calidad y demandas de mercado (Rasmussen, 2001).

Lo que ciertamente esta probado en términos de calidad nutricional y que el consumidor normal generalmente desconoce, es el importante rol que tiene el pescado en nuestra dieta y su consumo debería ser fuertemente impulsado. El pescado es una fuente confiable de proteína de alta calidad, Hierro, Selenio y Yodo. El hígado de peces blancos (*Gadus morhua* y *Merluccius gayi*) son una excelente fuente de vitaminas A y D. El filete de sardinas (*Sardinops sagax*), arenque (*Clupea spp*.) y jurel (*Trachurus spp*.) son una importante fuente de ácidos grasos altamente insaturados (n3-PUFA), tales como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6n-3). Los ácidos grasos n3-PUFA tienen beneficiosos efectos en numerosos enfermedades del hombre, por ejemplo previenen las afecciones cardiovasculares y ataques al corazón. El DHA es muy importante en el normal desarrollo de cerebro y retina del feto (Sargent *et al.*, 2001).

De acuerdo a Koumoundouros *et al.* (2003), otro aspecto escasamente estudiado son las malformaciones que tienen que ver con la calidad del pescado desde el punto de vista de su apariencia. Las anormalidades morfo-anatómicas degradan drásticamente el desempeño biológico de las especies en cultivo y distorsionan su apariencia, resultando en una reducción del valor

comercial e incremento de los costos de producción. Desde el punto de vista de la sustitución de la harina de pescado por otras fuentes proteicas este aspecto no ha sido estudiado en profundidad.

Otro factor que influye en la calidad son los pigmentos. Si bien estos no son nutrientes esenciales en los estados de desarrollo de los peces y hay poca evidencia que soporten un rol sanitario, en sistemas de producción intensivos de peces son muy importantes, pues la ausencia de ellos en los alimentos de engorde afectan la calidad de coloración del producto comercial. La astaxantina y la cantaxantina son incorporados en los alimentos acuáticos para seleccionadas especies a un nivel similar que los micronutrientes. Ellos cumplen un rol fundamental en la coloración del músculo blanco, especialmente en salmónidos (Baker, 2001).

Si bien el desarrollo de nuevas fuentes proteicas es importante, existe la necesidad de investigar la sustentabilidad de tales productos en las dietas para la acuicultura, poniendo atención no sólo al desempeño en el crecimiento sino que también a la calidad del pescado. La optimización de la calidad del pescado puede ser la vía para mejorar la aceptación del consumidor y dar mayor rentabilidad a los productos de cultivo.

Varios son los factores endógenos y exógenos que influencian la composición proximal y los atributos de calidad del pescado, por ejemplo la dieta, el ambiente, la ontogenia y el estado fisiológico (Bjerkeng *et al.*, 1997). De acuerdo a Rasmussen (2001), la calidad de los salmónidos esta afectada por parámetros tales como tipo de alimento, nivel de consumo diario (ración) y el crecimiento (engorde). La composición del alimento tiene la mayor influencia sobre la composición proximal en salmónidos. En particular, los lípidos corporales como también los lípidos del filete están directamente relacionado

con el contenido de grasa de la dieta. De igual modo, el perfil de ácidos grasos del filete está también fuertemente influenciado por el perfil de ácidos grasos de la dieta (Bell *et al*., 2001).

Mientras la composición del cuerpo aparece fuertemente influenciada por la composición del alimento, un incremento en otros parámetros tal como la ración de alimento y el tamaño del pez también resultan en un incremento la deposición adiposa y disminución en el contenido de agua del cuerpo del pez. El contenido de proteína, sin embargo, permanece más o menos estable (Rasmussen, 2001). Un incremento de los lípidos corporales en el pez, no es necesariamente un factor negativo, dependiendo de los propósitos que se quieran seguir. Si embargo, un incremento en la grasa corporal esta acompañado por una reducción en el rendimiento de la cosecha, debido a un incremento en el peso de vísceras en relación al peso del cuerpo (Bórquez *et al.* 1999).

Como se señalo anteriormente, la calidad del filete está fuertemente influenciada por la composición y cantidad de alimento consumido y la estrategia de alimentación, sin embargo, las características sensoriales, tales como olor, sabor, textura, etc. son sólo influenciadas en pequeña medida por estos factores (Rasmussen, 2001).

Bjerkeng *et al.* (1997) investigaron en el salmón del Atlántico la calidad sensorial, el color del filete, el contenido y distribución de la grasa y la composición proximal cuando se reemplazaba parcialmente la harina de pescado (10%) por harina de soja entera. Las dietas contenían 32 o 39% de grasa y 45–47% ó 38–40% de proteína. Las dietas con 32% de grasa representaban la composición de dietas comerciales. El análisis químico y la observación visual revelaron que los peces alimentados con dietas con alto

contenido de grasa, tenían más lípidos en la carcasa, mayores depósitos de lípidos abdominales y en los mioceptos. El análisis colorimétrico del músculo fue más alto en los salmones alimentados con dietas altas en grasa, sugiriendo que la absorción intestinal de astaxantina fue facilitada por el alto nivel de grasa en el músculo. Ellos no encontraron efectos significativos de la fuente de proteína sobre la cantidad de astaxantina en el músculo, la escala de color visual, la composición proximal, la deposición de grasa o las características sensoriales observadas. Concluyeron que la harina de soja entera puede reemplazar parcialmente a la harina de pescado sin comprometer la calidad sensorial. Anteriormente, Kaushik et al (1995), habían reportado que el reemplazo total de harina de pescado por productos de soja ocasionaba cambios en la calidad sensorial en salmónidos especialmente en el sabor; debido a la presencia de lípidos solubles volatiles y compuesto fenólicos ácidos, amargos y astringentes no volatiles y solubles en agua.

Williams *et al.* (2003) evaluaron la calidad organoléptica y composición de ácidos grasos del músculo de *Lates calcarifer* (barramundi) alimentado por 66 días con dietas donde se variaban las proporciones de harina de pescado y harina de carne. Los resultados mostraron que los filetes de peces alimentados con altos niveles de harina de carne fueron más suaves y firmes que los alimentados con altos niveles de harina de pescado. La evaluación del "sabor a pescado" fue también más alto para las dietas con altos niveles de harina de carne y más bajo para que una dieta comercial patentada para barramundi. La exclusión de toda fuente proteica marina no desmejoró el valor sensorial del pescado. La influencia de la dieta sobre el perfil de ácidos grasos mostró que la fracción de lípidos neutros de los peces alimentados con la dieta de harina de carne tenían una más alta proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena corta a expensas de ácidos grasos de cadena larga, especialmente 22:6n-3. Los lípidos polares sólo mostraron

un débil efecto de la dieta, lo cual fue limitado para los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

El efecto de la fuente de proteína sobre la susceptibilidad a la peroxidación de lípidos del músculo estudiado en *O. mykiss* (trucha arco iris) y *Dicentrarchus labrax* (lubina) mostró que bajo condiciones in vitro de peroxidación forzada por 240 minutos, el músculo de truchas y lubinas alimentadas con dietas que contienen harina de pescado como principal fuente de proteínas muestran los niveles más altos de peroxidación; mientras la peroxidación más baja fue encontrada en peces alimentados con dietas que contenían gluten de maíz. En este trabajo se concluye que la sustitución parcial de harina de pescado por proteínas vegetales en dietas para peces inducen a una más baja susceptibilidad de peroxidación del filete (Lopez-Bote *et al.* 2001).

Por otra parte, la composición lipídica de una materia prima vegetal puede tener efecto en la composición y calidad de la carcasa. Los ácidos grasos de los peces proceden de la dieta y del metabolismo que se realice en sus propios tejidos (Fernández, 1993). Como ya ha sido expuesto, las principales fuentes de lípidos en la dieta de los salmónidos son el aceite y la harina de pescado (Hardy, 1988), las cuales en general, presentan altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-3, PUFA (Guillaume & Metailler, 1999). Es por esto, que la composición de ácidos grasos en dietas que contienen materias primas de origen vegetal carentes de este tipo de ácidos grasos, puede afectar fisiológicamente al pez, sin que se manifieste efectos inmediatos en el crecimiento o la mortalidad (Storebakken *et al.* 2000b). Los peces de cultivo alimentados con dietas comerciales que contienen aceites o harinas de origen vegetal presentan mayores niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6 en los tejidos (Caballero *et al*. 2002; Bell *et al*., 200; Torstensen *et al*. 2000) los cuales pueden competir

metabólicamente con los ácidos grasos de la familia n-3 (Storebakken *et al.*, 2000b) disminuyendo así los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, presentes en el músculo y que son de interés para nutrición humana.

1.2. Harina y aceite de pescado, problemática actual

La acuicultura intensiva de especies carnívoras, específicamente la de salmónidos y peces marinos, es altamente demandante de alimentos de alto costo ricos en proteína y lípidos. Los costos por concepto de alimento representan sobre el 67% de los costos operacionales en el cultivo de especies salmónidas (Refstie, 2000), esto debido a que los principales insumos son harina y aceite de pescado. El reemplazo de proteína dietaria por lípidos, en los últimos años, ha reducido el costo de la proteína, sin embargo el problema subsiste, ya que el abastecimiento de ambos ingredientes provienen de una misma fuente (Hardy, 1994). En adición, hay un fuerte esfuerzo para definir y desarrollar nuevas fuentes de proteínas costo-efectivas que puedan al menos, parcialmente, disminuir el alto costo y la dependencia de la harina de pescado en la formulación (Hardy, 2006).

Los salmónidos y los peces marinos cultivados son en su mayoría carnívoros y se alimentan en la naturaleza de las presas vivas que capturan, por lo tanto, su aparato digestivo y todas sus funciones relacionadas con la digestión, absorción, y utilización metabólica se encuentran orientadas, de forma natural, a la propia naturaleza del alimento que habitualmente consumen (Blanco, 1995). Por esta razón, cuando han sido sometidos a cultivo se ha requerido del uso de la harina y aceite de pescado como ingredientes principales del alimento suministrado (Tacon, 1994).

La utilización de la harina de pescado, como principal fuente de proteínas en la fabricación de los alimentos comerciales de salmónidos y otros peces carnívoros se debe a sus relevantes características nutricionales. Elevada concentración proteica, rica en aminoácidos esenciales, fuente de vitaminas del complejo B y ácido fosfórico, además de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (Hardy, 1988). Todas estas cualidades le confieren un importante rol en el mercado mundial de alimentos para peces, aves, cerdos, vacas y mascotas (Robaina, 1998). Por su parte el aceite de pescado, junto con ser una importante fuente de energía, aporta ácidos grasos de la serie n-3. Particularmente 18:3n-3 y ácidos grasos de cadena larga (EPA y DHA).

En la actualidad la demanda por la harina de pescado se encuentra en aumento. La distribución de uso actual y futuro de la misma se muestra en la Figura 1, resaltando que al 2010 la demanda y competencia por este "comodity" será muy alta. De acuerdo a Pike y Zaldivar (2002) su disponibilidad mundial a alcanzado niveles de producción estáticos (Figura 2) y con tendencia a la disminución provocando un aumentando su precio. En los últimos tres años el precio de la harina de pescado ha variado entre US$ 600 y 1000 por tonelada métrica, con tendencia al alza desde 2001 al presente.

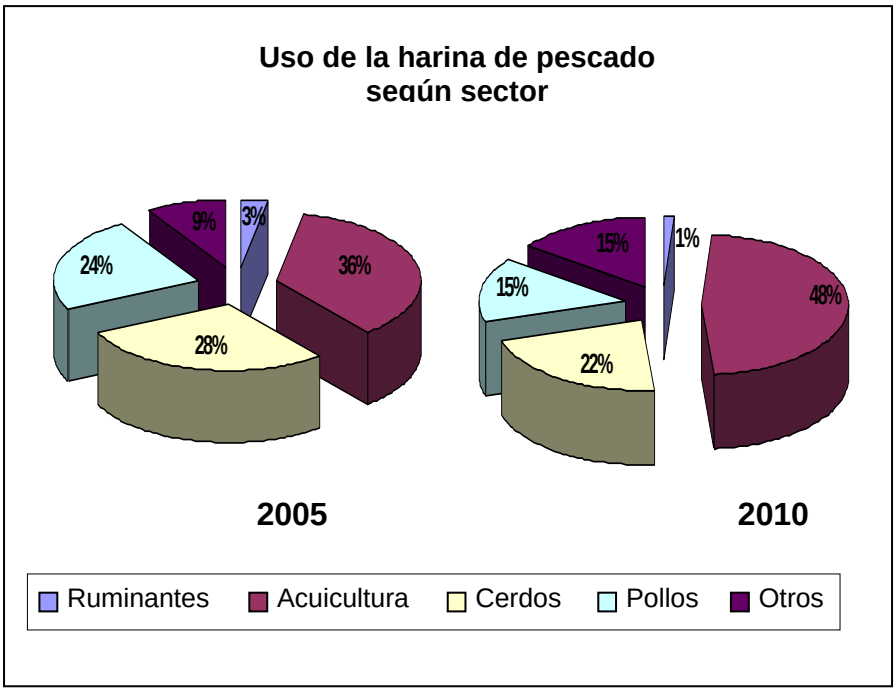


Figura 1. Uso actual de la harina de pescado y su proyección al 2010. (Fuente: IFFO 2006).

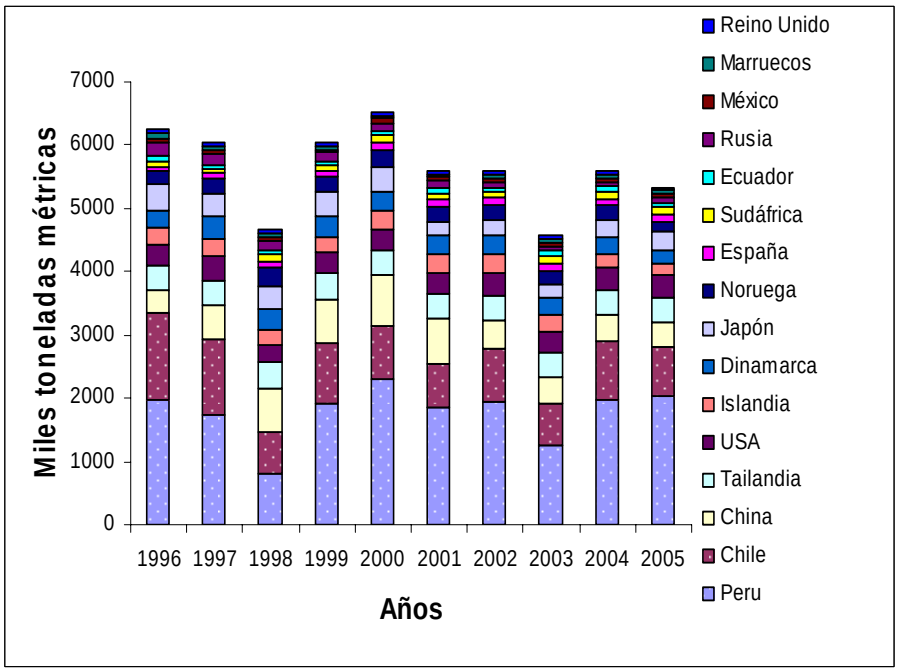


Figura 2. Producción mundial de harina de pescado según país y año (Fuente: IFFO 2006).

La situación del aceite de pescado no deja de ser diferente a la harina de pescado. De acuerdo a IFFO (2006), la producción mundial de aceite de pescado es de alrededor de 1,2 millones toneladas métricas (TM), y en los última década su producción se ha mantenido más o menos estable (Figura 3). Se prevé para el 2010 un abastecimiento insuficiente y un considerable cambio en la distribución de uso por sectores. Así por ejemplo la acuicultura pasará de un uso de 77% (2005) a 97% (2010) de la producción mundial. Mientras que el uso para consumo humano y uso industrial se reducirá desde 9% a 1% y desde 12% a 0%, respectivamente. Solamente se mantendrá el 2% actual para uso farmacéutico. La variación de costos del aceite de pescado ha sido considerable, en unos pocos años paso desde US$ 250 a alrededor de US$750, el ultimo valor asociado a "El niño" de 1998. Actualmente el precio del aceite de pescado oscila entre US$ 700 y 1200 la TM.

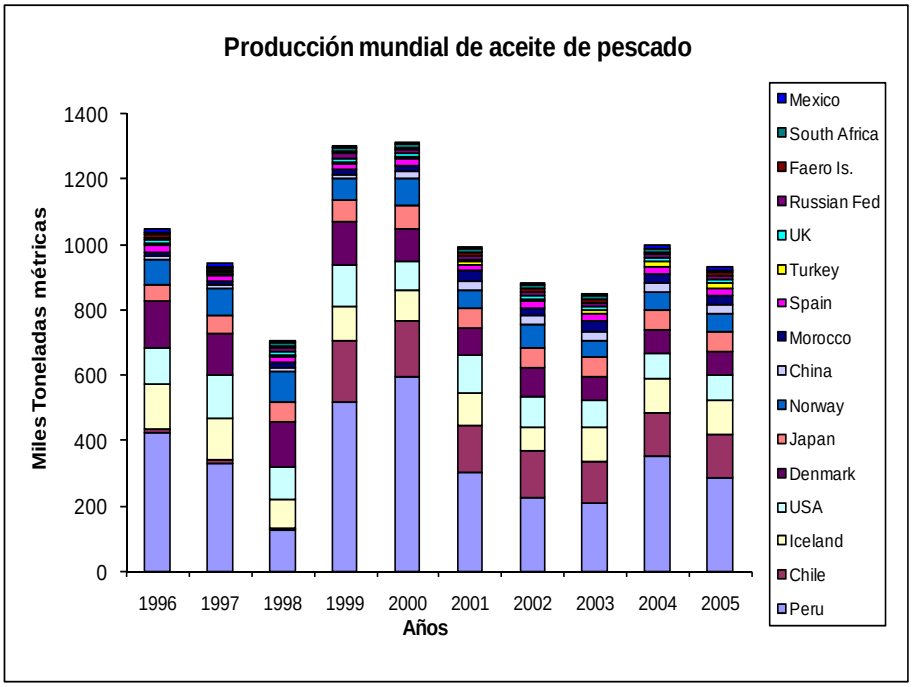


Figura 3. Producción mundial de aceite de pescado según país y año (Fuente: IFFO 2006).

A comienzos de la década de los setenta se presentó una reducción mundial de la disponibilidad de la harina de pescado causada por una significativa reducción en la cosecha de anchoveta Peruana (Adelizi *et al*., 1998). En la pasada década, la producción de harinas de pescado osciló entre 6 y 7 millones de toneladas métricas anuales y la de aceites de pescado entre 1 a 1,3 millones de toneladas anuales. La disminución del año 1998 fue una excepción causada por uno de los más grandes fenómenos del Niño, que han existido y que impactó a las pesquerías (Pike y Zaldivar, 2002); como consecuencia la producción de harina se redujo aproximadamente en un treinta por cien en Sudamérica, causando una disminución del veinte por cien en la producción global (Watanabe, 2002). Actualmente se utilizan entre 2,5 a 3,0 millones de toneladas de harina de pescado, como insumo para alimentos de acuicultura, y se vislumbra una eventual escasez mundial en las próximas décadas (Wurman, 2000). A pesar del estancamiento en los niveles de producción y de las variaciones ocasionales que puedan ocurrir, la demanda global por este insumo continúa creciendo. De acuerdo a IFFO (2006), la estimación para el año 2010 es que se utilizarán 3,5 a 4,0 millones de TM de harina de pescado en dietas para la acuicultura, es decir, entre un 50 y 66 por cien de la producción mundial actual.

La producción de harina de pescado viene determinada por el nivel de recursos disponibles, concentrándose en la explotación de un pequeño número de especies, por consiguiente, es dependiente de su comportamiento. Este tipo de producción trae consigo un tipo de mercado muy inestable, con unas disponibilidades y precios fluctuantes entre un año y otro (Robaina, 1998).

En Chile, cuatro especies pelágicas son las capturadas y destinadas a la elaboración de harina de pescado (Tabla 1). La Subsecretaría de Pesca de

Chile ha establecido para el recurso jurel una cuota anual de pesca desde 1999/2000. También desde 2002, el recurso sardina está sometido a una cuota anual. La caballa la cual no está sometida a ninguna cuota su captura; el desembarque ha incrementando en los últimos años.

El total de peces pelágicos usados para la industria de harina de pescado fue de 3,2 millones de TM en el 2003; 4,4 millones de TM en el 2004; 3,5 millones de TM en el 2005 y 3,1 millones de TM en el 2006 (Sernapesca, 2007).

La producción de harina de pescado en 2003 fue de 666 TM, en 2004 936.000 TM en 2005 fue de 790.000 TM y en 2006 fue de 734.000 TM (Mitrano, 2007). Por su parte, la producción de aceite de pescado ha ido en disminución desde 2001 a 2006 alcanzando en este año una producción de 112.000 TM (Mitrano, 2007).

Tabla 1. Total de captura de especies pelágicas usada para fabricación de harina de pescado en Chile (Fuente, Sernapesca, 2007).

Recurso	2006	2005	2004	2003
Anchoveta	905	1.473	1.860	823
Jurel	1.367	1.367	1.452	1.421
Sardina	549	463	518	466
Caballa	322	223	577	572
Total de captura	3.142	3.544	4.406	3.282

En Chile ha habido un cambio importante de la administración en sus industrias pesqueras. Ahora la Subsecretaría de Pesca está aplicando cuotas de pesca individuales para las compañías. La administración ha desempeñado un papel decisivo en asegurar que la pesca sea sostenible. Por muchos años Chile ha exportado tanto como podría producir, luego, a partir de 1990 las exportaciones cayeron debajo de la producción debido a la creciente industria de salmón dentro de Chile usando mucho más de su harina y aceite de pescado (Figura 4).

El incremento en la producción nacional de salmones y truchas, hacen que la demanda interna sea aproximadamente superior a 300.000 y 180.000 T. M. por año para la harina y aceite de pesacdao, respectivamente. Con las actuales políticas de crecimiento de la industria salmonera, que esperan duplicar la producción de salmónidos antes de 8 años, la demanda por la harina de pescado de igual forma se duplicara, lo cual convertirá progresivamente al país en un importador parcial de este insumo (Zaldívar, 2004). Situación que comenzó a evidenciarse ya a partir de 1993 (Figura 4).

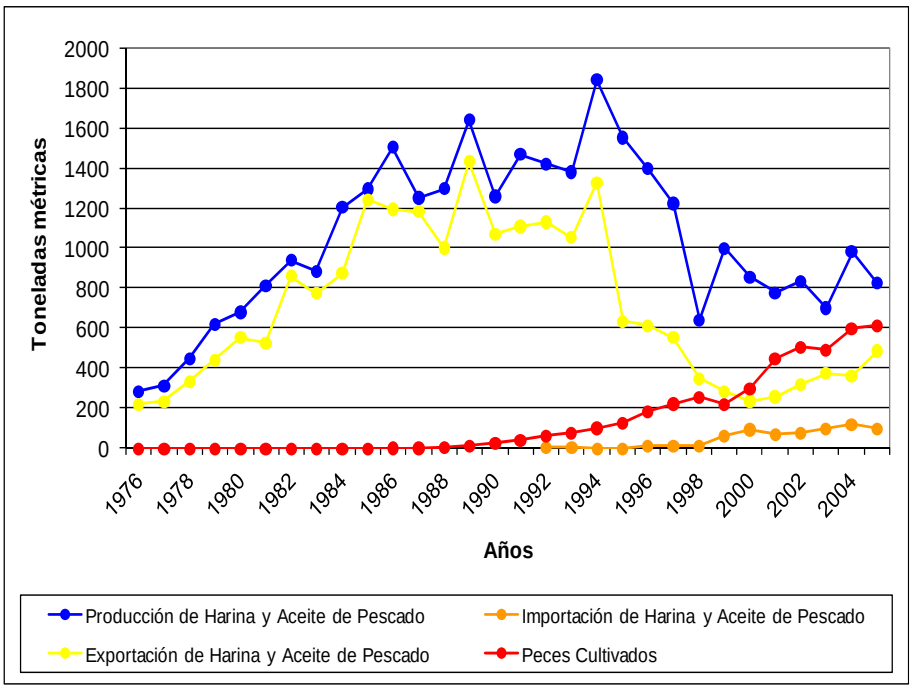


Figura 4. Producción Total, Importaciones y Exportaciones de Harina de Pecado y Aceite de pescado en Chile, incluida la producción de peces de cultivo (Fuente: SERNAPESCA, 2007).

1.3. Fuente de proteínas alternativas para la acuicultura

La actual situación de las pesquerías y como consecuencia la producción de harina de pescado, el desarrollo vertiginoso de la acuicultura, el crecimiento de la producción en China y la alta competencia por el uso de materias primas

proteicas de origen marino ha generado la necesidad de buscar y evaluar fuentes proteicas alternativas de, básicamente harinas de sub-productos animales y harinas de origen vegetal (Cheng y Hardy, 2002).

1.3.1. Proteínas de origen animal

1.3.1.1. Harinas de subproductos de animales invertebrados

Solo una pequeña porción de subproductos de animales invertebrados ha sido usada en alimentos para la acuicultura como reemplazantes de la harina de pescado (Tacon, 1994), y los ingredientes incluyen harina de pupa de gusano de seda (*Bombix mori*), harina de gusano terrestre (*Eisenia foetida*) y mezcla de zooplancton (mezcla de copépodos y cladóceros en razón 1:6).

1.3.1.2. Harinas de subproductos de animales vertebrados

Las harinas de subproductos de animales vertebrados han sido usadas en dietas animales desde mediados del sigo XIX (Cheng *et al*., 2002), y actualmente constituyen la segunda mayor fuente de proteína animal usada en alimentos para la acuicultura (después de la harina de pescado). Una amplia variedad de estos insumos ha sido evaluada como potencial reemplazante de la harina de pescado (Tacon, 1994). Por lo general disponen de altos contenidos proteicos y buenos perfiles de amino ácidos esenciales, sin embargo, pueden ser deficientes en uno o más de ellos (El-sayed, 1999).

Uno de los más utilizados, es la harina de subproductos avícolas (HSA) que corresponde al producto reciclado de los desperdicios durante la producción avícola, y esta constituido por las porciones no comestibles de estos desechos, sin incluir las plumas (Abdel-Warith *et al*., 2001). Desde el punto de vista composicional, la HSA contiene un porcentaje de proteína promedio de un 60% aproximadamente y es deficiente en el contenido de lisina. Presenta

además un bajo contenido de ceniza comparado con la harina de pescado (NRC, 1993). La producción anual total de este producto en EE.UU. es de 0,443 millones de TM y alcanza un precio cercano a los 300 dólares por TM.

La harina de pluma por su parte contiene alrededor de un 80% de proteína con niveles bajos de metionina y bajas cantidades de fibra y cenizas (NRC, 1993). La producción anual de harina de pluma en EE.UU. llega a 0,364 millones de TM, y su precio alcanza los 280 dólares por TM. El CDA de esta proteína para trucha arco iris es de entre 81 y 87 por cien (Bureau *et al*., 2000). La proteína presente en la harina de pluma proviene de la queratina en un 85-90% aproximadamente, la que a su vez posee un alto contenido de cisteína (8,8 por cien de la proteína), por lo tanto, debido a su estructura, este tipo de material debe ser hidrolizado como prerrequisito para ser digestible para los animales, ya que en su estado natural posee un bajo valor nutritivo; de esta manera, el grado de hidrólisis es un indicador de la concentración de proteína soluble presente en esta materia prima (Mendoza *et al*. 2001). Este tipo de harina ha sido usada en dietas para trucha arco iris (Satoh *et al*., 2002; Sugiura *et al*., 2000; Buerau *et al*., 2000), Carpa (Jahan *et al*., 2001) y camarón blanco del pacífico (Mendoza *et al*., 2001).

La harina de carne y hueso posee un 51% de proteína, siendo deficiente en el contenido de metionina (NRC, 1993). Aunque, de acuerdo a Stone *et al*. (2000), los niveles de proteína pueden aumentar al mezclar harinas de distinto origen, por ejemplo la mezcla de harina de vaca y harina de cordero produce un porcentaje de 60% de proteína aproximadamente. La producción anual en EE.UU. alcanza los 2,8 millones de TM y su precio varía entre 160 y 180 dólares por TM. (Alimentos Balanceados para Animales, 2003). En trucha arco iris alcanza valores de CDA para la proteína cercanos al 85% (Bureau *et al*., 2000). Por otro parte, la harina de carne sola contiene un 55% de proteína

(NRC, 1993). La producción anual en EE.UU. bordea los 0,101 millones de TM, y su precio varía entre 500-550 dólares por TM.

La harina de sangre registra valores cercanos al 90 por cien de proteína (NRC, 1993). El CDA para la proteína es entre 90 y 99% dependiendo del proceso de secado al que se someta, obteniendo mayores CDA con el secado en spray, en comparación con el secado a vapor (Bureau *et al*., 2000). Su precio alcanza entre 750 y 800 dólares por TM.

1.3.2. Proteínas organismos unicelulares

Las proteínas de organismos unicelulares incluye el uso de algas unicelulares y filamentosas, hongos y bacterias en forma seca como reemplazantes de la harina de pescado. Dentro de estas se incluyen algas (*Spirulina maxima, Chlorela spp*.), hongos (*Candida spp., Saccharomyces spp, Kluyveromyces spp., Phaffia spp.*) y bacterias (*Methanobacter spp., Pseudomonas spp., Micrococcus spp.*) (Tacon, 1994).

1.3.3. Proteínas de origen vegetal

Se espera que a futuro sea cada vez más común que las dietas contengan proteínas y aceites provenientes de vegetales. La competitividad de las harinas vegetales, frente a las harinas de pescado, se debe a su mayor producción, la cual no se encuentra limitada por la productividad natural del medio. Además muchas de ellas son subproductos agroindustriales y por consiguiente, los precios pueden llegar a ser muy competitivos (De la Higuera & Cardente, 1993). La búsqueda de nuevas materias primas es un desafío con el fin de minimizar el impacto que generan las fluctuaciones en la disponibilidad de los recursos marinos (Den Bieman , 2000).

Como fuentes de proteína vegetal se utilizan: cereales, semillas oleaginosas y leguminosas. A esto se le añaden los subproductos de las industrias de fermentación en el caso de los cereales, y los de la obtención de aceite en el caso de las oleaginosas (Guillaume y Metallier, 1999). Con niveles de proteína cercanos al 30%, además de presentar la mayoría de los aminoácidos esenciales (Petterson *et al.,* 1997), las leguminosas, como alfalfa, frijoles, arveja, haba y soya, han sido utilizadas en reemplazo de la harina de pescado. No obstante su empleo se ve reducido en muchos casos, debido a su utilización directa en la alimentación humana y hoy en día a su potencial uso en la producción de biocombustibles.

Según Refstie (2000), de sustitución de ingredientes en dietas para peces, deben satisfacer variados criterios, tanto de autoridades nacionales como internacionales, estos criterios incluyen la composición estándar, la calidad nutritiva y la inocuidad. Además, el potencial sustituto de la harina de pescado debe ser ampliamente caracterizado para justificar su uso en piensos para peces.

La valoración de una materia prima vegetal no sólo debe considerar el aporte nutritivo desde el punto de vista de los requerimientos del pez, sino que también es necesario valorar aspectos tales como digestibilidad de la materia prima y su relación con otros nutrientes (Glencross *et al*., 2007; Drew *et al.*, 2007; Glencross y Hawkins, 2004; Thiessen *et al* 2003; Burel *et al* 2000b; Storebakken *et al*., 2000a); deficiencias de aminoácidos esenciales, particularmente los ingredientes vegetales son deficientes en lisina y metionina (Tacon, 1994); presencia de factores antinutricionales y su efecto sobre la palatabilidad, digestión y absorción de nutrientes (Francis, et al. 2001). También, el tratamiento tecnológico (descascarado, extrusión, cocción o microondas) aplicado a materias primas de origen vegetal (Tabla 3) puede

mejorar el grado de utilización digestiva y tener significativas mejoras en los índices productivos de la especie (Glencross et al., 2005, Pereira y Oliva-Teles, 2004; Zongjia *et al.*, 2003; Gouveia y Davies, 2000; Carter y Hauler, 2000, Sudaryono *et al.*, 1999).

1.3.3.1. Harinas de Oleaginosas

La soja (*Glycine max*), es la fuente proteica vegetal mas usada en el reemplazo de la harina de pescado (Refstie *et al*., 2005; Mundheim *et al*. 2004; Cheng *et al*., 2003; Sales y Britz, 2003; Jahan *et al*., 2001; Refstie *et al*., 2000; Carter y Hauler, 2000; Vielma *et al*., 2000; Arndt *et al*., 1999). La conveniencia del uso de la soja, para reemplazar la harina de pescado ha sido determinada por ser efectiva en costos, sustentable y con bajo nivel en fósforo (NRC, 1993).

Sin embargo, las harinas de soja contienen aproximadamente 30 por cien de extracto no nitrogenado indigestibles (Refstie *et al*., 2000), además presenta variaciones en el contenido de nutrientes y factores antinutricionales, es sabido que la soya contiene al menos cinco inhibidores de la tripsina (Adelezi *et al*., 1988). Para mejorar su valor nutritivo, debe ser sometida a tratamientos de calor por periodos de tiempo y condiciones de humedad específicas. En el mismo sentido, el procesamiento de la soya para producir harinas y concentrados proteicos mejora sus propiedades nutricionales. Por ejemplo, el descascarado aumenta el contenido proteico de la harina de soya de 44,8% al 50%, valores muy superiores al 31,2 por cien que poseen los granos de soja secados al vapor (NRC, 1993); el concentrado proteico de soja, por su parte alcanza un 62% de dicho nutriente (Vielma *et al*., 2000). Carter y Hauler (2000), señalaron que el concentrado de soja produce los mejores resultados al reemplazar un 56 por cien de la proteína presente en la dieta para salmón

del atlántico en comparación a soja descascarada y desgrasada, solo desgrasada o harina de soja entera (sin extracción de lípidos).

El Raps o canola (*Brassica spp*.) es mayormente una fuente de aceite (40-45%), pero la harina de canola obtenida después de la extracción del aceite es una interesante fuente de proteína, poseedora de un contenido proteico de entre 32% y 45% (Burel *et al*., 2000a). Sin embargo, este tipo de harina contiene altas proporciones de fibra (30–40%), además de factores antinutricionales como taninos, saponinas y ácido fítico, y glucosinolatos (GLS) (Thiessen *et al*., 2001), cuyos metabolitos tienen una actividad goitrogénica, es decir, un aumento en el tamaño de la glándula tiroides en todos los animales, incluyendo peces. Por tales motivos, la calidad de la harina de raps ha sido mejorada considerablemente en los últimos años con selección genética de nuevas variedades *Brassica napus* y *Brassica campentris*, sin ácido erúsico y con bajo contenido de GLS (menor de 20–50 µmol/g) (Mwachireya *et al*., 1999). Por otra parte, tratamientos tecnológicos, como descascarado y la utilización de altas temperaturas y solventes orgánicos durante la extracción del aceite, se traducen en una disminución del contenido de GLS, fibra, saponinas y taninos (Burel *et al*. 2000b). Satoh *et al*., (1998) señalan que el concentrado proteico de cánola (CPC), y el CPC "defitinizado" (sin ácido fítico), puede ser incluido en un 39 por cien de proteína en la dieta para trucha arco iris. Además Kissil, *et al*. (2000), señala que el reemplazo total de la harina de pescado por CPC en dietas para trucha arco iris, es factible cuando se añade un mejorador de palatabilidad para evitar la disminución del consumo.

Otras harinas de oleaginosas usadas en dietas para la acuicultura son harina de maravilla (*Helianthus annus*) (Sanz *et al*. 1994; Sales y Britz, 2003), harina de maní (*Ariachis hypogaea)* (Richie y Brown, 1999; Sales y Britz, 2003) y

harina de algodón (*Gossypium sp.)* (Tacon, 1994; Lee *et al*., 2002), que poseen concentraciones de proteína de 40,7%, 48,1% y 41,2%, respectivamente.

1.3.3.2. Harinas de Cereales

Los granos de cereales son usados en dietas para peces con el fin de facilitar la aglutinación y expansión (Thodesen y Storebakken, 1998), y además como fuente proteica (Storebackken *et al*., 2000a). El mismo autor señala, que los salmónidos en general, hidrolizan en forma limitada el almidón en el intestino y no regulan eficientemente la concentración de glucosa cuando los niveles de extracto no nitrogenado digestibles son altos. Los representantes mas usados de este grupo vegetal son gluten de maíz (*Zea mays*), harina de gluten de trigo (*Triticum aestivum*), harina de trigo completa, y menos utilizada se encuentra la harina de cebada (*Hurdeum vulgare*), con porcentajes de proteína de 81,8; 62,0; 12,8 y 12,9%, respectivamente (Allan *et al*., 2000; Cheng *et al*., 2003).

1.3.3.3. Harinas de Leguminosas

Entre las harinas de origen vegetal, las leguminosas de grano, han sido ampliamente utilizadas en ensayos de reemplazo de la harina de pescado en piensos para peces (Allan, 1997). La Tabla 2 muestra un resumen de la composición proximal las principales materias primas vegetales utilizadas en piensos para la acuicultura. Numerosos estudios en salmónidos tratan sobre la inclusión de leguminosas (Gouveia *et al.*, 1993; Oberle *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 1994; Regost et al., 1999; Carter y Hauler 2000), en todos ellos se concluye que el reemplazo de la harina de pescado debe ser parcial, no alterándose así significativamente el crecimiento, la concentración de proteína corporal, la digestibilidad de los nutrientes y la energía.

Las leguminosas en general son ricas en alimdón, con valores cercanos o sobre el 50% (por ejemplo arvejas, habas y garbanzos) y con contenidos energéticos relativamente altos (Tacon, 1994, Allan *et al*., 2000 y Fontainhas-Fernández *et al*., 1999). En especies como salmónidos, la utilización digestiva de polisacáridos es limitada, sin embargo los tratamientos con calor y la extrusión producen el quiebre de la estructura del almidón, y así, generalmente se mejora su digestibilidad tanto proteica como energética (Burel *et al*., 2000a). La Tabla 3 muestra un resumen de la composición proximal de algunas materias rimas vegetales que ha sido tratadas con diferentes procedimientos tecnológicos con la finalidad de mejorar sus propiedad nutricionales y su utilización digestiva en especies acuícolas. Otro tratamiento tecnológico como el descascarado, produce una disminución en el contenido de fibra del grano (Davis *et al*., 2001), aumentando con esto la concentración de proteína cruda (Booth *et al*., 2001). Las leguminosas también son poseedoras de numerosos factores antinutricionales, sin embargo, gracias a la selección genética, hoy en día las distintas variedades contienen bajos niveles de inhibidores de la tripsina y lectinas, los cuales pueden ser posteriormente desactivados con las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de extrusión (Burel *et al*., 2000b).

Por otra parte el concentrado proteico en leguminosas también es posible, a modo de ejemplo, según los resultados de Carter y Hauler (2000), el concentrado proteico de arveja, alcanza un 49% de proteína cruda, y no representa diferencias significativas de ganancia en peso, al sustituir un 25 y 33% de la harina de pescado en dietas para salmón del atlántico.

Otras leguminosas usadas como harina en dietas para la acuicultura son harina de haba (*Vicia faba*), Garbanzo (*Cicer arietinum*) y Alfalfa (*Vicia sativa*), con concentraciones proteicas entre 27,7 y 31,3%, 21,6 y 24,2%, 30,9 y 32,3

por cien; para cada una de las harinas fabricadas de grano entero y grano sin cáscara respectivamente (Booth *et al*. 2001).

A nivel mundial una de las leguminosas de mayor potencial como fuente de proteína vegetal alternativa a la harina de pescado es el lupino (*Lupinus spp*), también conocido como altramuz o lupini (Glencross, 2001 y 2004). La situación de producción y uso del lupino será analizado separadamente en los próximos párrafos.

Tabla. 2 Composición proximal y digestibilidad aparente de las principales materias primas vegetales utilizadas en piensos para la acuicultura comparadas con harina de pescado. Los datos corresponden a materias primas sin ningún tratamiento, excepto la molienda. Modificado de DFWA, 2001.

	Garbanzo (a)3	Arvejas (b)1	Haba (c)3	Soja (d)1	Canola (e)1	Gluten trigo2	H. pescado1
Composición proximal							
Materia seca (g/Kg)	913	915	920	918	920	910	908
Proteína cruda (g/kg DM)	208	255	277	478	366	838	732
Grasa cruda(g/kg DM)	47	11	13	37	26	9	99
Cenizas (g/kg DM)	57	34	30	80	80	8	142
NFE (g/kg DM)	567	700	499	405	528	145	27
Energía bruta (MJ/kg DM)	19,4	17,0	17,3	17,0	19,9	22,6	21,3
Digetibilidad aparente							
Materia seca(%)	48,7	72,0	55,9	67,0	49,0	85,0	86,0
Proteína (%)	84,8	89,0	91,6	92,0	79,0	102	93,0
Energía (%)	53,6	83,0	62,2	71,0	53,0	84,3	89,0

(a) *Cicer arietinum*, semilla seca; (b) *Pisum sativum* cv. Dunn, semilla seca; (c) *Vicia faba*, semilla seca; (d) Harina de soja libre de grasa; (e) Harina de canola libre de grasa;
1 *Penaeus monodon*, 2 red seabream (*Pagrus auratus*), 3 silver perch (*Bidyanus bidyanus*)

Tabla. 3 Composición proximal y digestibilidad de las principales materias primas vegetales utilizadas en piensos para la acuicultura comparadas con harina de pescado. Los datos corresponden a materias primas a las cuales se les aplicó algún tratamiento tecnológico.

	Harina arvejas (a)1	Harina canola (b)1	Harina canola(c)1	Harina de soja(b)2	Harina de soja(c)2	Harina arvejas(a)3	Harina canola(b)3	Harina canola(c)3
Composición proximal								
Materia seca(g/kg)	909	937	915	910	910	909	937	915
Proteina cruda (g/kg DM)	260	431	433	529	448	260	431	433
Grasa cruda (g/kg DM)	4,5	48	9	16	183	4,5	48	9
Cenizas(g/kg DM)	33	79	82	72	53	33	79	82
ENN (g/kg DM)	612	379	391	383	316	612	379	391
Fósforo (g/kg) DM)	4,4	14,9	15,6	19,9	21,7	4,4	14,9	15,6
Digestibilidad aparente								
Materia seca (%)	71,5	57,1	64,6	-	-	66,3	70,8	66,6
Proteina (%)	92,9	82,9	91,9	55,8	69,0	87,9	90,9	88,5
Enargía (%)	77,7	69,3	80,9	86,0	84,8	68,9	76,4	70,0
Fósforo (%)	100,0	49,3	64,7	69,4	75,9	42,6	26,4	41,8

(1) Datos de Burel *et al.* (2000a) para *Scophtalmus maximus* (turbot), (2) McMeniman (1998) para *Lates calarifer* (seabass asiatico) y (3) Burel *et al.* (2000a) para *Oncorhinchus mykiss* (trucha arco iris). Tipos de tratamientos:(a) extruida, (b) desgrasada, (c) tratada con calor, (d) entera.

1.4. El lupino como ingrediente proteico alternativo en piensos de peces

1.4.1. Cultivo y producción en el mundo

Existen más de trescientas especies lupino, de los que sólo cinco son cultivadas (Glencross, 2001 y 2004) y de estas, sólo tres especies son explotadas comercialmente; lupino blanco (*Lupinus albus*), lupino dulce o de hoja angosta (*Lupinus angustifolius*) y lupino amarillo (*Lupinus luteus*) (Figura 5). El *L. Angustifolius* domina la producción mundial y mayoritariamente es producido en climas mediterráneos y en el sur de Australia Occidental.

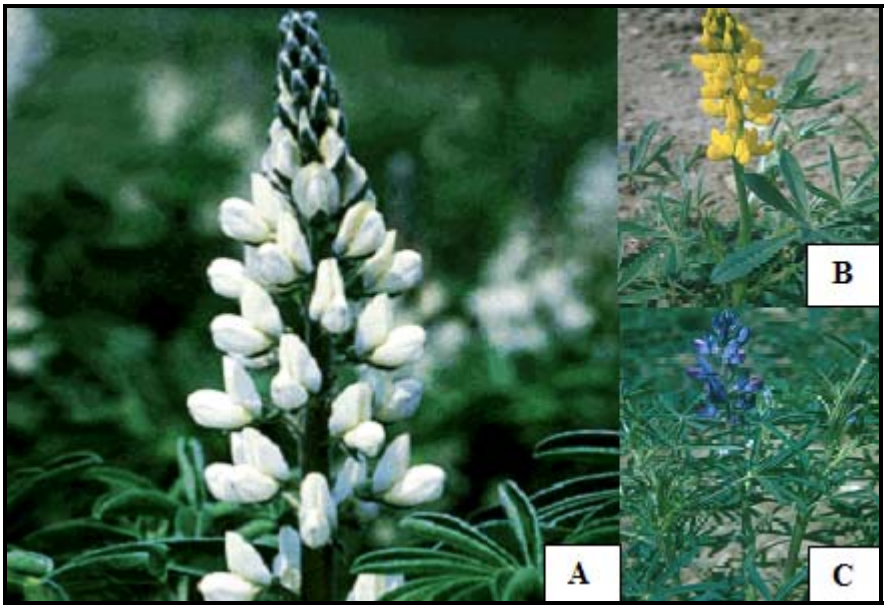


Figura 5. Especies de género Lupinus, que son explotadas comercialmente. A: *Lupinus albus*, B: *Lupinus luteos* y C: *Lupinus angustifolius*.

De acuerdo a DIG (2001), en la década de 1930 se desarrolló en Alemania las primeras selecciones de lupino dulce, libres de alcaloides, y que pueden ser consumidos directamente por el ser humano y los animales. Hoy estos lupinos son producidos como forraje o leguminosa de grano principalmente en la ex Unión Soviética, Polonia, Alemania y el Mediterráneo, además de producirse

como “rubro exportable” en Australia, para ser vendido al mercado europeo y asiático principalmente. La producción y el comercio mundial se concentra actualmente en este tipo de lupino, pero existe además una proporción muy inferior, aunque nada despreciable, de producción de lupino amargo, mayoritariamente en países del Mediterráneo, norte de África y Australia, los que son a su vez los principales actores del comercio internacional de este tipo de producto (unos como importadores y, en el caso de Australia, como exportador).

La producción de lupino en el mundo ha sido creciente, siendo actualmente del orden de los 1,7 millones de toneladas, de las cuales se comercializan internacionalmente unas 900 mil toneladas al año, ambas cifras referidas al lupino en general, sin distinción de especie y tipo de lupino. La superficie en producción es de aproximadamente en 1,4 a 1,5 millones de hectáreas, de las cuales Australia concentra un 90% (Figura 6). El 10% restante se reparte en más de 20 países, de los cuales sólo tres superan el 1% de la superficie mundial: Polonia (1,9 a 3,3%), Chile (1,1 a 1,2%) y España (1,0 a 1,2%).

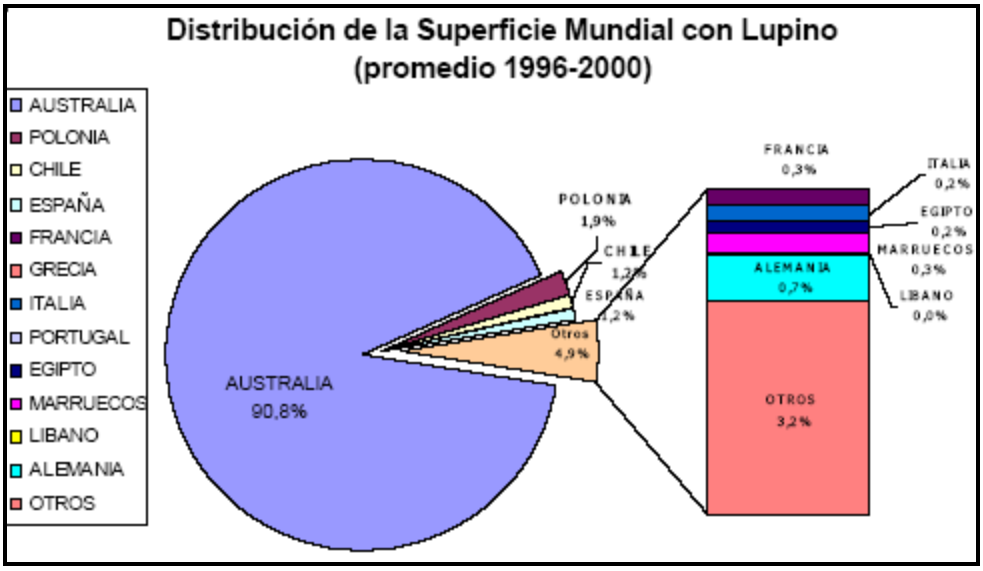


Figura 6. Distribución de la superficie mundial dedica al cultivo de lupino (DGI, 2001).

1.4.2. Situación del Lupino en Chile

En Chile el cultivo del lupino ocupa un lugar secundario en la agricultura, a pesar de su relevancia en las regiones sur del país y el potencial desarrollo que podría alcanzar. En forma silvestre existen dos especies de lupino en Chile; ellos son la yerba del traro *(L. microcarpus),* y el lupino andino de grano grande (*L. Mutabilis*), este último, originario de la Zona Norte de Chile, constituyo la base de la alimentación de las culturas precolombinas.

Los primeros lupinos introducidos al país fueron *L. Angustifolius,* de flor azul y amargos, que fueron utilizados como abono verde en las viñas a partir de los inicios del siglo pasado (von Baer, 2001). Debido a las condiciones de invierno húmedo, verano seco y suelos ácidos, del Centro sur y sur de Chile, hacen emerger al lupino como una leguminosa alternativa, para cultivo en el país (Peñaloza, 1997). En 1949 se da comienzo a la introducción de *L. albus* y *L. luteus,* dulces o de bajo contenido de alcaloides, para fines forrajeros. Sólo al alcanzar una superficie superior a 10.000 ha en 1976 el lupino fue considerado como cultivo, no diferenciándose entre dulce, amargo, blanco o australiano.

Actualmente el cultivo del lupino se concentra en la producción del lupino blanco (*L. albus*) y el lupino amargo (*L. angustifolius*). El primero esta en manos de agricultura empresarial fundamentalmente destinado a la alimentación animal. El lupino amargo por su parte, se encuentra tradicionalmente en manos de la agricultura campesina, mayoritariamente de origen mapuche que, con un nivel bajo de tecnología y costos, lo emplean hace mas de 30 años en la rotación del cultivo de trigo y como otra fuente de ingresos.

La superficie cultivada en Chile, ha fluctuado entre 15.000 y 28.000 ha (Figura 7), concentrándose principalmente en la Región de la Araucanía (ODEPA, 2006). Desde la temporada 2002/03 el área de cultivo el área de cultivo viene con un crecimiento sostenido, producto de la demanda del sector salmonero.

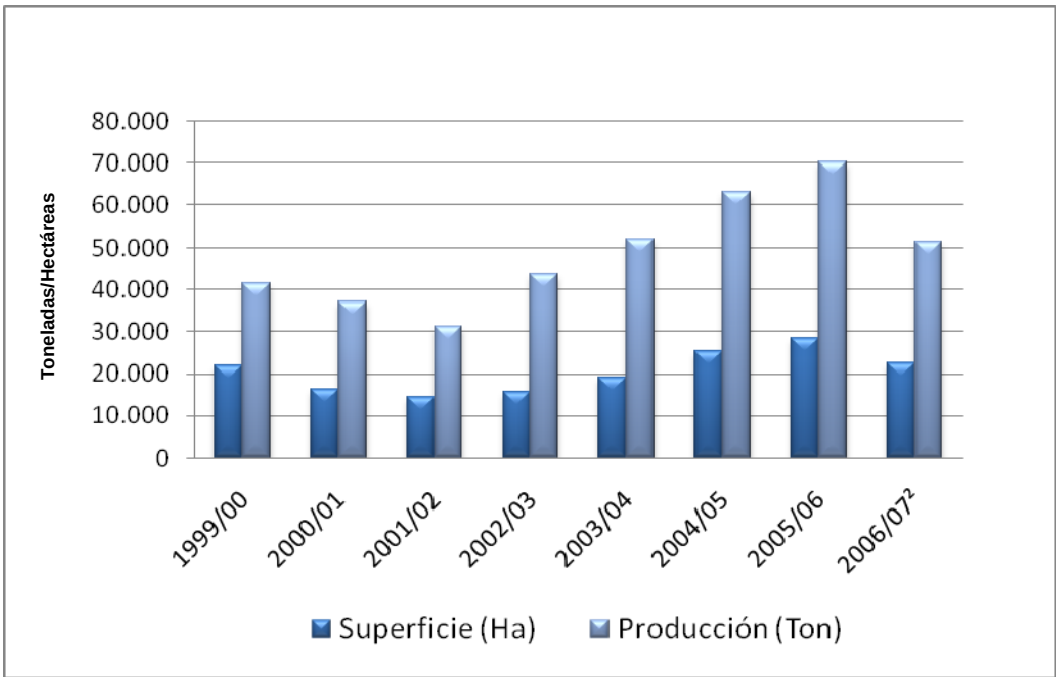


Figura 7. Evolución de la superficie sembrada y producción Lupino en Chile. Periodo 1999/00 a 2006/07. ² Cifras provisorias. Fuente: ODEPA (2006) con información de INE, IANSA, industrias aceiteras y CCT.

Los rendimientos han fluctuado entre los 10 y 60 quintales/ha con un promedio de alrededor de 20 quintales/ha (von Baer, 2001).

Los principales usos del lupino producido en el país están en el mercado interno (Peñaloza, 1997), siendo empleado en la alimentación animal, en rumiantes monogástricos, aves y peces, entre otros.

Por otro lado, más allá de las industrias que hoy consumen la mayor parte del lupino dulce en Chile, existe un gran potencial en la industria de alimentos

para peces, debido al encarecimiento de la soja y sus derivados, siendo el lupino una de las opciones aparentemente viables en términos técnicos y económicos para su sustitución (Hughes, 1988; Hughes, 1991). Durante el año 2007 se produjeron casi sobre el millón de toneladas de alimento para peces en Chile, se estimándose que el 1% de los ingredientes corresponde a lupino descascarado proveniente de agricultura nacional, aún cuando los productores de alimento no reconocen que han empezado a usar lupino en sus fórmulas.

Esta tendencia de crecimiento sostenido de la industria acuícola ha sido favorable para los precios de venta del lupino, a raíz de los contratos de siembra que se han comenzado a ofrecer desde la temporada pasada para lupino dulce, por parte de esta industria de piensos, es así como en la última cosecha se lograron valores de $ 90 por kilo (US$ 0,155), para el lupino amargo y de $ 105 (US$ 0,181) por kilo para el lupino dulce (ODEPA, 2006).

1.4.3. Valor nutricional del lupino

El nivel de proteína de las harinas de leguminosas varia según si es elaborada con el grano entero o descascarada, o bien si ha sido extraído o no los lípidos, cuando se trata de oleaginosas. El lupino no es distinto, y alcanzará altos niveles de proteínas, comparable con la harina de soya desengrasada, dependiendo del tratamiento que se le aplique (Tabla 4). La harina de lupino se produce normalmente por el descarado de la semilla y la posterior molienda. El perfil de aminoácidos del lupino varía según especies y variedades (Tabla 5). En términos generales es deficiente en lisina y metionina; cuando se usa en piensos para peces en concentraciones altas estos aminoácidos deben ser compensados de forma adecuada.

De acuerdo a Yánez *et al*. 1983, en Chile, los niveles de proteína cruda de las distintas variedades de lupino entero (semilla) oscilan entre un 31 y 34%, las semillas de *L. angustifolius* y *L. albus* variedad astra y multolupa, contienen un 35% proteína cruda, mientras que el *L. luteus* puede llegar a un 44% de proteína cruda (Tabla 5)

Tabla 5. Composición proximal de las semillas de Lupino cultivadas en Chile.

Composición	*L. albus* (var. astra)	*L. albus* (var. Multolupa)	*L. luteus*	*L. angustifolius*
Humedad	8,5	9,0	9,9	10,2
Proteina (%MS)	35,3	34,7	44,4	34,2
Extracto Etereo (%MS)	10,7	12,8	5,4	5,6
Cenizas (%MS)	3,8	3,6	3,9	3,2
Fibra (%MS)	13,1	11,3	16,8	13,1
NFE[1]	37,1	37,6	29,5	43,9

[1]Calculado por diferencia. Modificado de Yánez *et al.* 1983

La totalidad de las proteínas presentes en la harina de lupino son relativamente ricas en lisina comparadas entre ellas, aunque deficientes en aminoácidos azufrados, como metionina y cistina, fenómeno que limita su inclusión en la formulación de alimentos (Petterson, 1997). La composición de aminoácidos de las variedades de lupino cultivadas en Chile se muestra en la Tabla 6, comparada con el perfil de la harina de pescado.

Tabla 4. Composición química de los principales productos de lupino en comparación con la harina de pescado y la harina de soja (todos los valores se expresan en g/Kg de MS a menos que este especificado de otra forma).

Nutriente	H. pescado chilena	Harina de soja	H. lupino amarillo *[1]	H. lupino blanco *[2]	H. lupino dulce*[3]	H. lupino dulce[3]	C. proteico de lupino**	P. aislada de lupino
Materia seca (MS)	917	909	903	922	885	911	942	926
Proteina cruda	770	518	547	455	415	351	690	810
Proteina digestible	673	477	485	402	354	n.d.	679	770
Grasa cruda	68	47	87	137	53	65	93	125
Cenizas	142	69	44	36	33	30	31	30
Fósforo	22	8	6	5	4	3	5	5
Materia orgánica	858	931	956	964	967	970	969	970
Energía bruta (MJ/kg MS)	21,3	19,6	20,9	21,3	20,4	20	22,2	22,6
Energía digestible (MJ/Kg MS)	21,1	14,1	13,4	14,8	10,8	n.d.	18,7	20,6
Lisina	57	34	23	20	18	18	25	25
Treonina	34	23	16	16	14	14	23	23
Metionina	21	8	4	3	3	3	5	4
Isoleucina	32	25	16	19	16	15	27	28
Leucina	56	42	35	31	28	27	51	51
Valina	39	27	17	18	16	15	23	24
Fenilalanina	30	28	18	17	16	15	28	28
Histidina	31	16	14	11	12	10	15	16
Arginina	43	40	47	52	44	45	78	81

1, L. Luteus; 2, L. Albus; 3, L. Angustifolius; ** extraído por solventes; *descascarada; n.d.: no determinado; C: concentrado; P: proteína (Glencross, 2004, modificada).

Tabla 6. Composición de aminoácidos (g/100g proteína) de las especies de lupino cultivadas en Chile.

Aminoácidos	*L. albus* (v. astra)	*L. albus* (v.multolupa)	*Lupinus luteus*	*Lupinus angustifolius*	*Harina de Pescado*[1]
Esenciales					
Arginina	7,8	8,6	8,5	9,1	5,0
Fenilalanina	3,5	3,9	3,5	3,6	4,0
Histidina	-	0,8	3,2	-	2,5
Isoleucina	3,1	4,1	3,1	3,3	4,3
Leucina	6,7	7,4	7,3	6,7	7,3
Lisina	3,7	4,3	4,8	4,5	5,8
Metionina	0,3	0,5	0,4	0,4	2,4
Treonina	3,9	4,1	3,5	3,6	3,6
Triptofano	-	-	-	-	1,1
Valina	2,7	3,6	2,8	3,0	5,4
No esenciales					
Á. Aspartico	10,6	9,5	10,2	9,7	-
Á. Glutámico	21,5	21,6	25,4	24,3	-
Alanina	3,1	3,3	3,2	3,4	-
Cistina	1,0	1,2	2,0	1,3	0,9
Glicina	3,8	3,6	3,5	4,0	-
Prolina	3,5	4,3	3,7	4,2	-
Serina	5,3	4,9	5,0	5,5	-
Tirosina	4,4	4,8	2,7	3,6	3,2

Modificado de Yánez *et al*., (1983); [1]Burel *et al*., (1998)

El Lupino no es reconocido como una oleaginosa, sin embargo la harina de lupino blanco tiene una razonable cantidad de lípidos de entre el 13 y 14 % en base seca. *L. luteos* y *L. angustifolius* tienen bajos niveles de lípidos no superando el 8% en base seca. El análisis de los lípidos crudos ha revelado que los triglicéridos constituyen el 71% de los lípidos totales, el remanente esta compuesto por fosfolípidos (14,9%), esteroles libres 5,2%, glicolípidos (3,5%), esteroles y esteres de ceras (0,5%), ácidos grasos libres (0,4%) y 0,4% de hidrocarbonos y material ceroso no identificado

(Glencross, 2004). El perfil de ácidos grasos en el aceite de las diversas especies de lupino se muestra en la Tabla 7**.**

Tabla 7. Composición de ácidos grasos de las especies de lupino cultivadas en Chile.

Ácidos grasos	**Nomenclatura**	***L. albus***	***L. luteus***	***L. angustifolius***
Mirístico	14:0	0,10	-	0,2
Palmítico	16:0	7,76	4,8	11,0
Esteárico	18:0	1,56	2,5	3,8
Araquídico	20:0	1,18	2,6	0,9
Behénico	22:0	3,88	7,1	1,9
Lignocérico	24:0	0,65	0,8	0,4
Palmitoléico	16:1	0,35	-	0,1
Vacénico	18:1 n7	2,10	0,7	0,7
Elaidico	18:1 n9t	1,00	-	4,0
Oleico	18:1 n9c	49,85	20,3	33,5
Eicosanoico	20:1	4,34	1,8	0,3
Erucico	22:1		0,8	< 0,01
Linoleico	18:2 n6	17,20	47,3	37,1
Linolénico	18:3 n3	9,45	8,0	5,3
Eicosadienoico	20:2	-	-	0,4
Eicosatrienoico	20:3	-	-	0,2
Araquidónico	20:4	0,40	-	0,0

Modificado de Petterson *et al*., (1997).

Los ácidos grasos saturados, están compuestos principalmente por el ácido palmítico (16:0), representando un 11% en *L. angustifolius*, 8% en *L. albus* variedad astra, 5,7 % en *L albus* variedad multolupa y 4,8 % en *L. luteus*. También, dentro de este grupo es posible encontrar solo trazas de ácido mirístico (14:0) y muy bajas cantidades el ácido esteárico (18:0). El mayor porcentaje de ácidos grasos presentes en el lupino corresponde a los monoinsaturados, siendo el ácido oleico (18:1n9c), el más importante. Los valores de este ácido graso varían de acuerdo a la especie, encontrándose en *L. albus* un 49%, en *L. angustifolius* un 33,5% y en *L. luteus* un 20,3%. En relación a la composición de ácidos grasos poliinsaturados, la semilla de lupino contiene cantidades apreciables de

ácido linoléico (18:2n6), entre un 17.2% en *L. albus* y un 47.3% en *L. luteus*. Además existen niveles importantes del ácido linolénico (C18:3n3), siendo mas abundantes en *L. albus* (9.5%), las otras especies presentan porcentajes menores, aunque bastante superiores a otras leguminosas (Masson & Mella, 1985).

Los carbohidratos contenidos en la harina de lupino, son muy diferentes a otros granos, poseen altos niveles de polisacáridos soluble e insolubles no almidón (NSP). Este grupo de carbohidratos forma primeramente la estructura de polisacáridos de la semillas. El almidón esencialmente no existe en la semilla de lupino. Los azucares libres contenidos en la harina de lupino están dominados por glucosa y galactosa, cada una con alrededor de 30 a 40g/Kg MS (Glencross, 2004).

Los factores antinutricionales encontrados en materias primas vegetales son uno de los principales factores que limitan en altos niveles de inclusión en piensos para peces (Tacon, 2002). La Tabla 8 muestran resume los principales grupos de factores antinutricionales encontrados en vegetales utilizados en piensos para peces; la toxicidad y concentración puede variar de una especie a otra y dentro de las variedades de una misma especie (Francis *et al.*, 2001).

Tradicionalmente altos niveles de alcaloides fueron encontrados en lupino, sin embargo el nivel de alcaloides en las nuevas variedades mejoradas son usualmente menores que 200 mg/Kg. El desarrollo genético de variedades de lupino “dulce”, se ha traducido en granos con bajos niveles de alcaloides, de entre 130 a 150 mg/Kg (DFWA, 2001).

Tabla 8. Principales factores antinutricionales en lupino comparado con otras materias primas proteicas vegetales.

Factor Antinutricional	Soja (a)	Lupino (b)	Canola	Arvejas
Alcaloides (mg/Kg MS)	10	200	n.d.	n.d.
Glucocinolatos (mol/Kg MS)	n.d	n.d.	9000	n.d.
Lecitinas (diluciones)	n.d	n.d.	n.d.	4
Oligosacaridos (g/Kg MS)	60	50	30	35
Fitatos (g/Kg MS)	15	5	40	5
Inhibidor proteasas (g/Kg MS)	3,1	0,2	n.d.	2,9
Saponinas (g/Kg MS)	5000	573	n.d.	n.d.
Taninos totales (g/Kg MS)	n.d	n.d.	1,8	3,7

n.d.: no disponible; (a) Harina descascarada y desgrasada; (b) Harina semilla entera de *L. angustifolius.* Tomado de Glencross (2002).

Aún cuando no se han reportado datos sobre la influencia de alcaloides en peces, ellos son considerados disuasivos alimentarios por su sabor amargo (Glencross, 2002). Otro potencial factor antinutricional en lupino son los oligosacáridos; estos compuestos son encontrados en harinas proteicas de legumbres, los altos niveles de oligosacáridos pueden interferir con la digestión de otros nutrientes, provocan efectos osmóticos en el intestino y fermentación anaeróbica de azucares provocando producción de gas. Glencross *et al.* (2003b) evaluaron la extracción de oligosacáridos y la adición de enzimas exógenas en harina de lupino y encontraron significativas mejoras en la digestibilidad y en la mayoría de los parámetros nutritivos en trucha arco iris. La eliminación del componente de etanol soluble en la harina de lupino tuvo una mayor influencia en la mejora de la digestibilidad.

En general, el nivel de la mayoría de los factores antinutricionales en lupino son considerablemente menores que en otras fuentes proteicas vegetales. Notablemente el lupino está desprovisto de inhibidores de proteasas, saponinas, lecitinas, taninos y glucocinolatos (Glencross, 2004).

1.4.4. Uso de lupino en acuicultura

El reemplazo de la harina de pescado por harina de lupino en dietas para las distintas especies de salmónidos ha sido reportado con resultados satisfactorios, en cuanto a crecimiento y digestibilidad. Numerosos estudios han demostrado que el lupino presenta buena aceptación y un gran valor nutricional como ingrediente en muchas aplicaciones dietarias en acuicultura (De la Higuera *et al.*, 1988; Hughes, 1988; Hughes, 1991; Gouveia *et al.,* 1993; Morales *et al.,* 1994; Robaina *et al.,* 1995; Burel *et al.,* 1998; Robaina, 1998;; Burel *et al.* 2000a; Carter & Hauler, 2000; Farhangi & Carter, 2001; Bransden *et al*., 2001; Glencross *et al*., 2002; Bórquez y Alarcón, 2002; Glencross *et al*., 2002, 2003a, 2003b, 2004, 2005, 2006, 2007). La proteína y lípidos que componen el lupino, constituye la mayor parte de la energía digerible de este ingrediente en el alimento, la proteína del lupino presenta a menudo una digestibilidad superior al de otras fuentes de proteínas vegetales y animales (DFWA, 2001) (Tabla 9). El lupino presenta una ventaja económica, sobre la utilización de otras harinas vegetales como la soja, lo cual la convierte en una fuente alternativa de reemplazo bastante atractiva (Hughes, 1988).

Recientes estudios de utilización digestiva de las principales especies de lupino comparadas con soja en trucha arco iris (Tabla 9), han mostrado que la digestibilidad de la materia orgánica, de la energía y la del nitrógeno/proteína, no presenta diferencias significativas. Además, notables diferencias se han encontrado en la digestibilidad del fósforo; la digestibilidad del fósforo en lupino es del 100% al ser valuada en *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, en cambio la digestibilidad del fósforo en soja solo alcanza el 45 por cien (Glencross y Hawkins, 2004).

Al igual que en salmónidos, la harina de lupino puede ser una fuente de proteína alternativa en el alimento de peces marinos. Trabajos realizados en la dorada *(Sparus aurata)* han demostrado un crecimiento similar a los

alcanzados con inclusiones de soya, a igual nivel sustitución (Robaina *et al.,* 1995). Otra de las especies en las cuales ha sido utilizado el lupino con excelentes resultados es el rodaballo (*Scophthalmus maximus*); juveniles alimentados con un 50% de inclusión de lupino no exhiben efectos adversos en el crecimiento, ni tampoco cambios en la composición corporal (Burel *et al.* 2000b).

Tabla 9. Digestibilidad de harinas de lupino comparada con soja y gluten de trigo en *O. mykiss* y *S. auratus* (Glencross y Hawkins, 2004).

Nutrientes	**Lupinus Albus*	**Lupinus angustifolius*	**Lupinus luteus*	Soja desgrasada	Gluten de trigo
O. mykiss ("stripping")					
Materia orgánica	59.3[2]	58.0[2]	55.5[2]	65.5[2]	88.4[1]
Fósforo	100.0[1]	100.0[1]	100.0[1]	45.0[2]	62.2[2]
Energía	64.0[2]	62.4[2]	64.9[2]	75.1[2]	90.7[1]
Nitrogeno/proteina	88.3[2]	93.1[12]	95.3[12]	86.8[2]	100.0[1]
Pagrus auratus (decantación)					
Materia orgánica	52.8[4]	49.7[4]	60.7[3]	74.4[2]	93.5[1]
Fósforo	100.0[1]	100.0[12]	90.9[2]	81.7[3]	72.8[3]
Energía	60.9[4]	62.4[4]	69.5[3]	81.0[2]	95.8[1]
Nitrógeno/proteína	100.0[2]	99.1[2]	97.7[3]	96.2[4]	100.0[1]

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores de las medias entre los ingredientes, pero no entre nutrientes ni especies (P<0,05). *Harinas sin cáscara, molienda de cotiledones.

Como consecuencia del vertiginoso crecimiento de la acuicultura intensiva y la posible limitación de la harina de pescado, hoy existe la necesidad de fuentes alternativas de proteínas. Este es el escenario en el cual se encuentra la acuicultura chilena, pero al igual que con la harina de pescado, la Salmonicultura Chilena puede tener ventajas competitivas, si comienza a usar el lupino, no sólo por las bondades nutricionales de esta materia prima, comparado con otros ingredientes vegetales, sino también porque el sur de Chile posee condiciones inmejorables para producir tanto lupino como la industria lo demande.

1.5. Utilización proteica y lipídica en peces y su relación con materias primas vegetales

Las proteínas difieren de otras macromoléculas biológicamente importantes, tales como los carbohidratos y lípidos en su estructura básica. Así por ejemplo; en contraste con la estructura de dichos grupos químicos, que a menudo están formados por la repetición de unidades idénticas o muy similares (ej. almidón, glicógeno y celulosa), las proteínas por el contrario, pueden estar formadas hasta por 100 unidades básicas diferentes (aminoácidos). Por lo que consecuentemente es posible tener una gran variabilidad y rango de compuestos, no sólo en relación a la composición, sino también en cuanto a la forma de la proteína (Tacon, 1989).

Las proteínas son el más abundante material orgánico en el tejido de los peces, ocupan alrededor del 65 a 75% del total en base seca. Los peces consumen proteína para obtener aminoácidos. La proteína es digerida o hidrolizada y libera aminoácidos libres, los cuáles son absorbidos en el tracto intestinal y distribuidos a través de la sangre hacia los órganos y los tejidos (Twibell y Wilson. 2002).

Las proteínas son requeridas en la dieta para proveer aminoácidos esenciales y nitrógeno para la síntesis de aminoácidos no esenciales. Las proteínas en los tejidos del cuerpo incorporan alrededor de 23 aminoácidos y entre estos 10 aminoácidos deben ser abastecidos en la dieta pues los peces no pueden sintetizarlos. Los aminoácidos son necesarios para el mantenimiento, crecimiento, reproducción y renovación de tejidos. Una gran proporción de los aminoácidos consumidos por el pez son catabolizados para la obtención de energía. Los peces están bien adaptados para usar un exceso de proteína por esta vía. El catabolismo de las proteínas hace que se libere amonio (Bureau y Cho, 2005), compuesto que en elevadas proporciones resulta tóxico para los animales.

El valor nutricional de las proteínas dietéticas no es idéntico. El valor nutricional de una fuente de proteína esta en función de su digestibilidad y perfil de aminoácidos. De acuerdo a Twibell y Wilson (2002), la deficiencia de aminoácidos esenciales genera una escasa utilización de la proteína dietética, por lo tanto retarda el crecimiento, la ganancia en peso vivo y la eficiencia del alimento. En varios casos, la deficiencia reduce la habilidad para resistir enfermedades y aminora la efectividad del mecanismo de respuesta inmune. Según Bureau y Cho (2005), la deficiencia de triptófano en peces provoca escoliosis y deficiencias de metionina producen cataratas. Tacon (1995), revisa detalladamente los signos morfológicos de carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces de cultivo.

El requerimiento proteico es afectado por el contenido energético de la dieta, disminuyendo en altas densidades de energía, consecuentemente la comparación de requerimientos se debe hacer con respecto a la energía. Sobre esta base, es claro que los peces tienen un requerimiento de proteína mayor que los mamíferos carnívoros los cuales, a su vez, tienen un requerimiento mayor que los mamíferos omnívoros. Las dietas para salmónidos generalmente contienen 35-45% de proteína digestible (PD), ó 40 a 45% de proteína cruda. Sin embargo, los aminoácidos o la proteína deben ser suministrados en relación a la energía digestible (DE). La razón recomendada de proteína digestible/energía digestible en dietas para salmónidos es de 20 a 26 g/MJ (92-102 g de proteína por Mcal). Cuando se incrementa esta proporción, se incrementa la excreción de amonio; también se incrementan los requerimientos de oxígeno disuelto porque la eficiencia con la cual la energía es usada disminuye (Bureau y Cho, 2005). En otras palabras, la fijación de proteínas en el músculo disminuye porque estas han sido utilizadas como fuente de energía.

Los requerimientos de proteína en los peces son mucho más altos (dos a cuatro veces) que en otros vertebrados. Esta observación ha dirigido a ciertos investigadores a sugerir que la eficiencia de utilización de las

proteínas es más baja en peces que en otros animales (Tacon y Cowey, 1985). Los requerimientos de proteínas de los peces no son tan disímiles que lo de otros vertebrados cuando son expresados en términos de consumo relativo de alimento (gramos de proteína por kilogramo de peso por día) y ganancia en peso vivo (gramos de proteína por kilogramo de peso vivo ganado). Bowen (1987), citado por Twibell y Wilson (2002), comparó varios parámetros relativos al consumo de proteínas para el crecimiento en peces y otros vertebrados y encontró pequeñas diferencias en la utilización de proteínas entre las especies comparadas (Tabla 10).

De acuerdo a Robaina (1998), la retención neta de N por el pez es aproximadamente del 40%. Este valor es similar al de los pájaros y mamíferos omnívoros, existiendo sin embargo, importantes diferencias en el metabolismo de las proteínas de los peces y los animales de sangre caliente. El músculo del pez, el cual comprende aproximadamente el 60% de su peso total, es muy blanco y glucolítico y aunque las tasas de síntesis de proteínas en él son muy bajas, mucha de la proteína allí sintetizada es retenida. Consecuentemente, muchas de las pérdidas de N por el pez probablemente ocurren como resultado de una oxidación directa de los aminoácidos, principalmente en el hígado, después de que sean asimilados. Por el contrario, pájaros y mamíferos omnívoros tienen mayores tasas de renovación proteica que los peces, siendo ésta la principal causa de las pérdidas de N en este tipo de animales.

Tabla 10. Parámetros relacionados con el consumo de proteína para crecimiento de peces y otros vertebrados.

Parámetro	Peces[1]	Otros Vertebrados[2]
Tasa crecimiento específica (incremento diario en porcentaje)	2,76	2,44
Proteína en la dieta (gramos / Kg de alimento)	400,30	200,00
Consumo proteína para máximo crecimiento (mg proteína ingerida/g peso húmedo/día)	16,50	12,00
Eficiencia de retención proteica [100x(g prot. retenida/g prot. ingerida)]	31,00	29,00
Razón de eficiencia proteica (g crecimiento/g de proteína ingerida)	1,94	1,96
Eficiencia conversión de alimento (g crecimiento/g de dieta ingerida)	0,78	0,26

1 valores medios de 18 estudios en peces, 2 valores medios de 8 estudios incluye ternero, pollo, cordero, cerdo y rata blanca. Datos de Bowen (1987) en Twibell y Wilson (2002),

La toxicidad de los componentes nitrogenados excretados por los peces constituye unos de los factores más limitantes de la acuicultura intensiva. La concentración dietética de proteína en alimentos para peces carnívoros es muy alta, pero su contenido de grasa puede variar entre especies y sistemas de producción. Las dietas para la producción de trucha ración en agua dulce son formuladas con altos niveles de proteína y con 15 a 25% de grasa e intentando obtener una baja excreción de fósforo, para limitar la contaminación de los cuerpos de agua dulce. Cuando las mismas especies son criadas en agua de mar para alcanzar más de 3 Kg el contenido dietario de grasa, puede exceder el 30% y el rango de concentración de proteína variar de 35 a 40%. En agua de mar el nitrógeno es más limitante para el crecimiento algal que el fósforo (Refstie, 2000), en este sentido, la utilización de materias primas proteicas de origen vegetal, en dietas para peces, al igual que otras fuentes de proteínas deben ser convenientemente equilibradas con el nivel de energía de la dieta, afín de hacer un uso optimo de la proteína y minimizar la excreción de productos nitrogenados; una ventaja adicional para las materias primas proteicas vegetales es que algunas de ellas (ej. Lupino, gluten) tienen niveles de fósforo altamente digerible por los peces (Glencross, 2004).

El aporte de lípidos es un importante factor en la alimentación, debido a su elevado contenido energético, siendo además un importante componente del alimento de los peces. Como fuente de grasas principalmente se utilizan los aceites de pescado y más recientemente los aceites vegetales.

Las grasas procedentes de la alimentación son tratadas a nivel de intestino por los fermentos pancreáticos, como la lipasa, y descompuestas en glicerol y ácidos grasos libres, que, con el concurso de la bilis, atraviesa la barrera epitelial del intestino y son absorbidas, pasando al espacio linfático. Los ácidos grasos, se transforman nuevamente en triglicéridos, se asocian al parecer a una proteína fijadora y a otros compuestos lipídicos, como el colesterol y fosfolípidos, forman determinadas lipoproteínas y, de esta forma, son transportados por la sangre. Los lípidos, tanto los recién absorbidos a nivel intestinal como los procedentes de otros tejidos de almacenamiento, para poder incorporarse a un medio líquido, como es la sangre, tienen que atenuar su carácter hidrófobo asociándose a moléculas hidrófilas, como la proteína fijadora. Esta proteína, y es por esto lo importante de la alimentación artificial, tendría mas afinidad por los ácidos grasos insaturados que por los saturados. Los ácidos grasos de cadena corta pasan directamente, a la sangre a través del hígado (Blanco, 1995). Los lípidos de esta forma llegarían a los tejidos, en donde serian utilizados dando origen como producto final a energía, agua y anhídrido carbónico o, por el contrario, pueden ser almacenados como reserva (Blanco, 1995).

Los ácidos grasos esenciales desempeñan un papel decisivo para la flexibilidad y permeabilidad de las membranas plasmáticas, funcionalismo normal de las mitocondrias y actividad enzimática (ATPasa). La elevada necesidad de los peces en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la serie n3, se relaciona con el bajo punto de fusión de estas grasas y puede explicarse por las condiciones térmicas inferiores en comparación con los mamíferos (Bell, *et al.*, 1986). Los ácidos grasos poliinsaturados tienen

gran importancia para el transporte de algunas vitaminas y otras grasas, son precursores de la síntesis de prostaglandinas y participan en la formación del sistema nerviosos (Watanabe, 1982).

Por tanto, ácidos grasos poliinsaturados son requeridos para mantener la función celular; estos no pueden ser sintetizados por los peces y deben ser entregados en el alimento (Sargent *et al.* 1988). En experiencias intensivas realizadas en truchas arco iris se comprobó que al ácido linolénico (18:3n3), era de máxima importancia para esta especie, y que superaba al ácido linoleico (18:2n6) en lo referente a estimulación del crecimiento y mejora de la conversión del alimento (Steffens, 1987). Al administrar ácido linolénico (18:3n3), con los alimentos los salmónidos son capaces de transformarlo en ácidos grasos poliinsaturados de cadenas largas (HUFAs), principalmente en ácido eicosapentaenoico (20:5n3, EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6n3, DHA) por medio de elongaciones y desaturación, elevando las cantidades de HUFAs presente en los tejidos (Henderson, 1996). En cambio, la incorporación de ácido linoléico (18:2n6), se traduce en una elevación de las concentraciones de los ácidos araquidónico (C20:4n6), docosapentaenoico (C22:5n6) y docosatrienoico (C20:3n9), en el organismo de la trucha (Steffens, 1987). Además de un crecimiento deficiente y un mal aprovechamiento del alimento, en caso de faltar el ácido linolénico (C18:3n3), en la dieta se observan como manifestaciones carenciales erosiones en las aletas, sobre todo en la aleta caudal; hígado pálido, aumentado de volumen y afectado por degeneración grasa, así como miocarditis local aguda (Fernández, 1993). A nivel de tejidos se observa un incremento en el contenido del ácido oleico (18:1n9) (Furuita *et al*., 1996; Takeuchi *et al*., 1996).

Aunque los salmónidos tienen la capacidad de utilizar los ácidos grasos de la serie n-6, lo que permite ahorrar los ácidos grasos de la serie n-3 (Guillaume, 1991), se ha demostrado la competencia entre los ácidos grasos de ambas series (n3 y n6), como sustratos de varias enzimas

implicadas en el metabolismo de los lípidos (Robaina, 1998), siendo los excesos de ácidos grasos n-6 perjudiciales en la utilización de los de la serie n-3 (Storebakken *et al*., 2000b).

El principal sitio de la lipogénesis en los peces es el tejido hepático, siendo regulada tanto por el nivel dietario de lípidos como por la composición de los mismos (Robaina, 1998). Como consecuencia de su importancia en el metabolismo alimenticio, las alteraciones del hígado son muy importantes; la degeneración lipídica del hígado, debida a la infiltración de grasa en el mismo, es un hallazgo común en los salmónidos cultivados. El aparato digestivo se sobrecarga normal por una alimentación con niveles elevados de grasas inadecuadas (Roberts *et al.*, 1980). Un desequilibrio en la composición de ácidos grasos de la dieta afectaría de forma negativa la acumulación de grasas en el hígado (Robaina, 1998).

Estudios histológicos realizados en el hígado de dorada (*Sparus aurata*) las cuales habían sido alimentados con dietas en donde se incluyó harina de lupino fue muy similar a la de los peces alimentadas con la dieta control. Se observo un pequeño número de gotas lipídicas, junto con alguna reducción del glucógeno en el citoplasma de los hígados de los peces alimentados con dietas que contenían una inclusión de un 20 y un 30% de lupino (Robaina 1998). Al parecer no son afectados los índices hepatosomáticos, por los diferentes niveles de inclusión de la harina de lupino tanto en trucha arco iris como en dorada (Carter y Farhangi, 2001; Robaina, 1998). Sin embargo la inclusión de altos niveles de otros tipos de harinas vegetales como la harina de arveja en las dietas de lubina europea (*Dicentrarchus labrax L*.) y harina de soya en dorada evidencia claramente un aumento de los depósitos de glucógeno y lípidos en el hígado (Russell *et al*., 2001; Robaina, 1998).

La composición de ácidos grasos en los salmónidos depende, entre otras, del medio ambiente, del sexo y la edad, como igualmente de la

composición de ácidos grasos contenidos en el alimento (Watanabe, 1982; Berg, 2000) siendo esta última de gran importancia bajo condiciones de cultivo.

Es un hecho bien conocido que al utilizar altas proporciones de aceite de soya, ello produce salmones con menos sabor a pescado del que tiene el salmón que se ha producido utilizando mayoritariamente aceite de pescado. El conocimiento de la relación entre grasas vegetales y calidad del salmón y la trucha será muy importante en los próximos años (Berg, 2000). Diferentes trabajos muestran que la calidad de los lípidos del filete se ven ampliamente influenciados por la proteína contenida en el alimento Resultados obtenidos por Gomes *et al*. (1993), quienes sustituyeron la harina de pescado por una mezcla entre harina de arvejas y raps en dietas para trucha arco iris, sostienen que esta mezcla puede ser utilizada en niveles de un 20% de inclusión sin que se evidencien efectos negativos en el crecimiento y la composición de ácidos grasos del músculo. Cuando se utilizan niveles de 45% de inclusión de mezcla entre harina de arvejas y canola en la dieta, se incrementa en el músculo, los ácidos grasos n6, principalmente debido a un aumento en los niveles del ácido linoléico (18:2n6), no experimentando variaciones en el contenido del ácido araquidónico (20:4n6). Sin embargo, aunque los niveles del ácido docosahexaenoico (C22:6n3) permanecían estables, el resto de los ácidos grasos de la serie n3 presentaban una tendencia decreciente, afectando de esta manera la relación n-3/n-6 (Gomes *et al*., 1993; De Francesco *et al.*, 2004).

1.6. Estado actual de la salmonicultura y la industria de alimentos en Chile

La producción mundial de salmones y truchas en el año 2006 alcanzó la cifra de 1.6 millones toneladas. Los principales productores y la distribución porcentual de la producción se desagrega de la siguiente forma, Noruega

(39,7%), Chile (38,2%), Reino Unido (7,8%), Canadá (7,6%), Islas Faroe (1%), U.S.A. (0,9%), Irlanda (1,0%), Finlandia (1,0%), Japón (0,6%), Australia (1,0%), Nueva Zelandia (0,5%), Suecia (0,4%), Dinamarca (0,4%) e Islandia (0,2%). La Figura 8 muestra el crecimiento de la producción de salmónidos cultivados en los últimos 16 años, el incremento promedio anual de la producción en este periodo ha sido de un 10%.

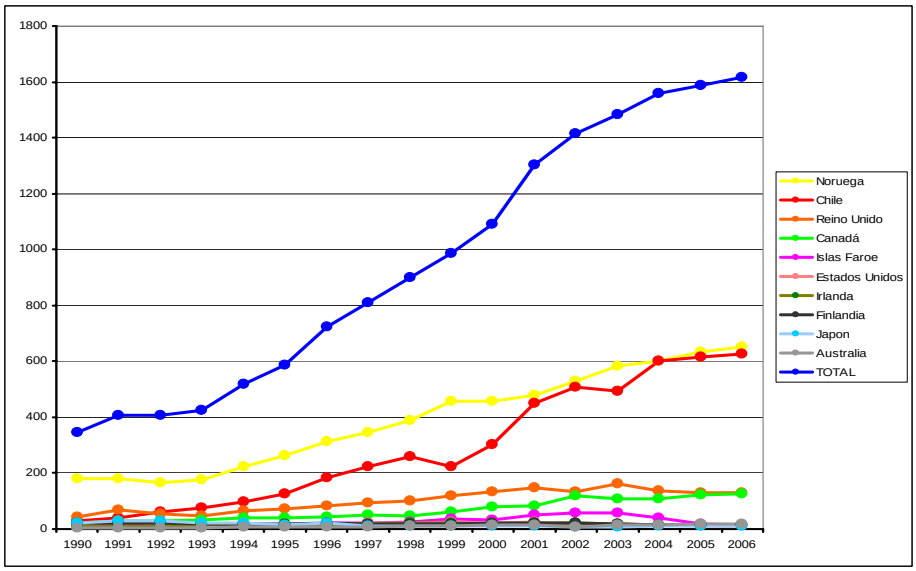


Figura 8. Evolución de la producción de salmónidos de los diez principales productores mundiales.

La captura de salmón silvestre en los últimos 16 años ha variado entre los 676 mil TM (1990) y 838 mil TM (2006) (SalmonChile, 2007). A partir del año 1996 la producción de salmónidos de cultivo superó a la captura silvestre y hoy en día representa el 66% de la producción mundial de salmónidos (Figura 9).

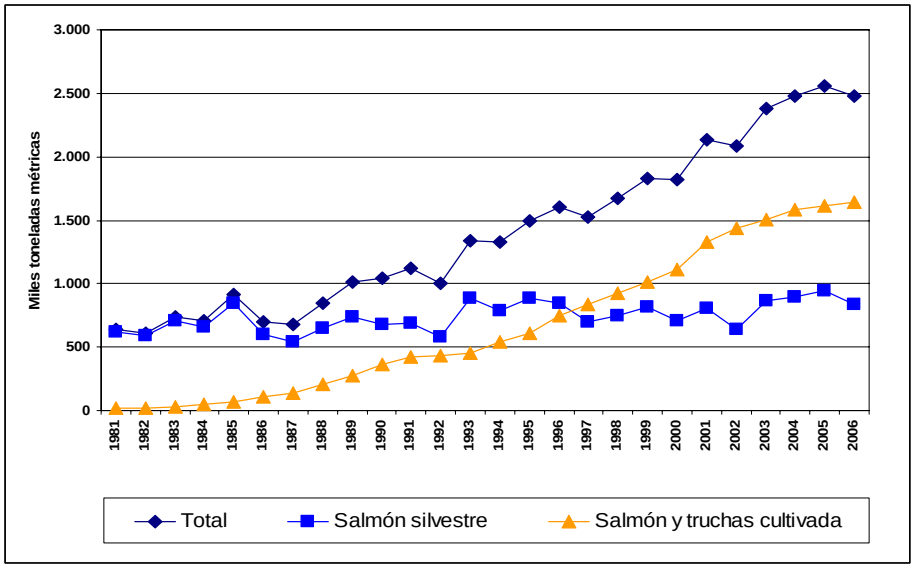


Figura 9. Evolución de la producción mundial de salmónidos silvestres y de cultivo. Fuente: SalmónChile, 2007.

En sus veinte años de desarrollo, la industria del salmón chilena ha logrado posicionarse como el cuarto sector exportador del país con retornos en el año 2006 de US$ 2.207 millones; genera 30.000 puestos de trabajo directos en centros de cultivo y plantas de proceso, y otros 15.000 empleos indirectos a través de diferentes rubros proveedores. Chile es el segundo productor de salmón a nivel mundial, con una producción de 628 mil toneladas representando un 38,2% de la producción mundial, cifras año 2006 (SalmonChile, 2007).

La Figura 10, muestra los principales destinos de las exportaciones chilenas de salmones y trucha en miles de dólares. De acuerdo a SalmonChile (2007), los principales destinos de los productos de la salmonicultura chilena son: Japón (32%), U.S.A. (36%), UE (14%), América Latina (7%) y otros mercados (11%).

Profundamente ligada a la salmonicultura ha sido la evolución de la industria del alimento para peces, en la actualidad produce alrededor de 1.2 millones de toneladas métricas, en no más de cinco industrias dedicadas exclusivamente a la producción de piensos para peces, también

algunas empresas salmoneras tienen sus propias plantas de alimentos en un sistema de producción integrado verticalmente.

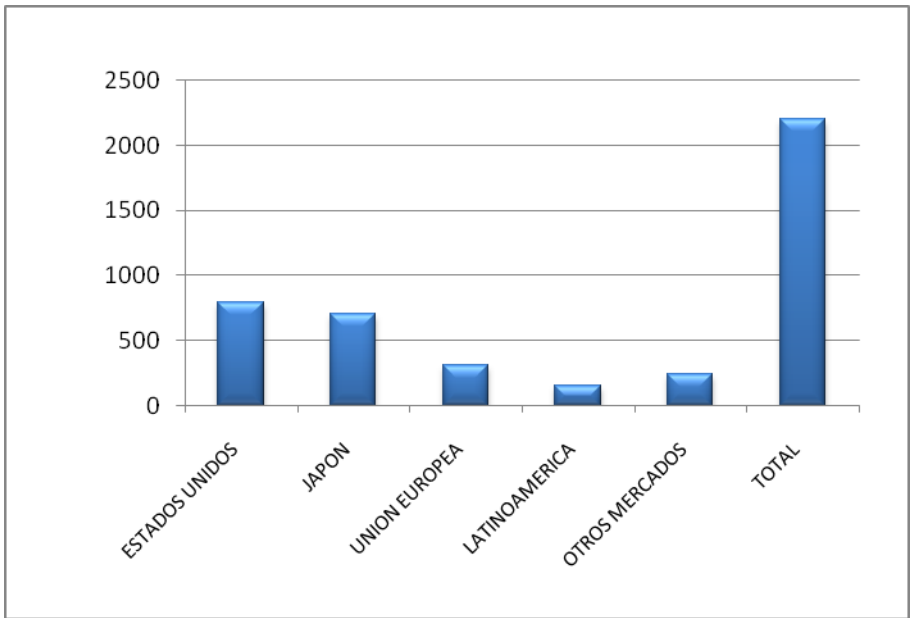


Figura 10. Exportaciones de salmón y trucha chilenas según destino, valores en miles de dólares. Fuente: SalmónChile, 2007.

Actualmente la industria de alimentos para el sector acuícola chileno se centra en la producción de alimentos balanceados para salmones y truchas, rubro en que el país se encuentra en un adecuado nivel comparado con los mercados mundiales en cuanto a calidad, variedad y rendimiento. En el caso de los alimentos balanceados formulados en Chile comparativamente con el Hemisferio Norte, hasta 1997 sus principales diferencias radican en las concentraciones de lípidos y la variedad de fuentes proteicas utilizadas; los segundos utilizan entre 20 a 50 ingredientes. Actualmente, en términos niveles de lípidos, se trabaja con valores muy similares a los utilizados en Noruega, sin embargo aún se está lejos en variedad de ingredientes proteicos utilizados, estos se limitan a no más de 7 a 8 ingredientes proteicos (Visión acuícola, 2007).

Ante la importancia de Chile como productor de salmón y truchas de cultivo, las principales multinacionales fabricantes de alimento han llegado

para satisfacer la demanda existente, es así como subsidiarias de Skretting, Biomar y Ewos tienen plantas en el país. También existen dos industrias nacionales Salmofood y Alitec, esta última fue comprada recientemente por el Holding Biomar.

La tendencia del sector salmonero chileno es aprovechar las innovaciones tecnológicas ocurridas en países más desarrollados, reflejándose esto en aumentos en la eficiencia de producción al cambiar por ejemplo de un alimento pelletizado a uno extruído, lo que ha permitido reducir los factores de conversión del alimento de casi 2,0 de hace 10 años a 1,1 a 1,3 como promedio actual. La industria de salmón Noruega alcanza factores de conversión entre 0,7 a 1,0.

En la actualidad, cerca del 90 por ciento o más de la producción de alimento es variedad extruído, porcentaje que se estima continuará creciendo dada las ventajas que presenta, tales como: la adecuada porosidad que permite absorber una mayor cantidad de aceite (grasa), lo que proporciona mayor cantidad de energía necesria de los organismos en cultivo y permitiendo así que las fuentes proteicas sean utilizadas exclusivamente para crecimiento. Actualmente las dietas para engorde de salmones se componen de 35 a 40% de proteína y 35 a 40%% de grasa (Biomar, 2004).

En la búsqueda de alimentos más “amigables” con el ambiente, se realizan investigaciones tendientes a reducir el contenido de fósforo en los alimentos para salmónidos. En promedio, estos contienen 1,5% de dicho elemento. Reemplazando parte de la harina de pescado entera por harina deshuesada e incorporando además, harinas de plumas en un 7%, se obtienen alimentos con excelentes rendimientos productivos y con niveles más bajos de fósforo (Bórquez *et al.*, 1996).

Aún cuando en Chile, el crecimiento de la industria de alimentos se encuentra en un ritmo sostenido, existe una gran preocupación por el

abastecimiento de materias primas. Concientes de esta situación los fabricantes han desarrollado estrategias para optimizar el uso de los recursos y buscar otras alternativas más estables en el tiempo (Visión Acuícola, 2007). Las principales investigaciones en la producción de nuevos alimentos de bajo costo para peces están orientados a la búsqueda de materias primas proteicas de origen vegetal (Visión Acuícola, 2006), Como se vislumbra a mediano y largo plazo una escasez de harina de pescado a nivel mundial las empresas del rubro e instituciones científicas y tecnológicas chilenas han comenzado a trabajar en la búsqueda de materias primas alternativas a la harina de pescado. Sin embargo, la producción actual de harina de pescado chilena bordea las 900.000 toneladas métricas, de las cuales aproximadamente el 30% es utilizada en la producción de alimentos para salmónidos, si los niveles de incorporación se mantuviesen en ese orden de magnitud, existiría la posibilidad de triplicar la producción actual de alimentos si los precios de la harina y de los demás materias primas se mantuviesen en el nivel actual de precios.

Por otra parte, una de las principales demandas de los clientes de las empresas de alimento es la garantía de productos libres de organismos genéticamente modificados (GMO). Los elaboradores de alimento acotan el tema exigiendo a sus proveedores de soja y gluten de maíz, una certificación reconocida por la autoridad de origen (productos de Brasil, Argentina y Paraguay) que garantice que estas materias primas no provienen de GMO. La búsqueda de nuevas materias proteicas de origen vegetal que puedan producirse en el país dará una mayor garantía de trazabilidad para la industria de alimentos y para la industria productora de salmónidos.

1.7. Proyecciones y contribuciones del estudio

Este tesis busca contribuir al conocimiento de la nutrición de salmónidos al evaluar la sustitución parcial de harina de pescado por harina de lupino (*Lupinus albus*) en dietas comerciales para la Salmonicultura chilena. No obstante, se han realizado numerosos estudios con resultados satisfactorios en el uso de *Lupinus spp* en dietas para peces, la industria de piensos chilena y los propios productores de peces, tienen cierta reticencia al uso de lupino y otras materias primas vegetales en dieta para salmones y truchas.

Asumiendo que este insumo tiene un carácter bifuncional, por el aporte de proteínas y lípidos se utiliza el grano entero en la fabricación del pienso bajo condiciones industriales a fin de valorar el comportamiento del grano en el proceso el proceso el de extrusión.

El trabajo desarrollado en esta tesis apunta también a impulsar la agricultura del lupino en el sur de Chile, región que ofrece condiciones excepcionales para la producción de esta y otras leguminosas proteicas. Esto no sólo posibilita nuevas materias primas para la industria de alimentos acuícolas, sino que también abre nuevas alternativas para la agricultura del sur de Chile.

1.8 Objetivos

Objetivo general

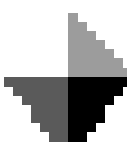
1. Evaluar el lupino blanco (*Lupinus albus*) desde el punto de vista nutricional y productivo como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile.

Objetivos específicos

1. Evaluar el uso digestivo, en salmónidos, de la harina de lupino cruda y sometida a tratamientos de calor húmedo y calor seco.

2. Evaluar la digestibilidad y rendimientos zootécnicos, en salmónidos, de dietas comerciales con bajos y altos niveles de sustitución de lupino blanco.

3. Evaluar como afectan las altas inclusiones de lupino en la calidad de la carcasa y en el epitelio intestinal de salmónidos.



CAPÍTULO II:

Material y métodos generales

2 MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

El presente estudio consto de cinco experimentos que fueron desarrollados en los laboratorios y la estación experimental "Piscicultura Los Laureles" de la Escuela de Acuicultura en la Universidad Católica de Temuco. Los tres primeros experimentos se focalizaron en el estudio de digestibilidad de harina de *Lupinus albus* (como materia prima cruda y tratada con calor seco y calor húmedo) en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) y Salmo salar (salmón del Atlántico). Los dos restantes, consistieron en evaluar la incorporación del grano entero de *Lupinus albus* en dietas comerciales de trucha arco iris en niveles bajos y altos. Se evaluó la digestibilidad de las dietas, el efecto sobre los parámetros productivos y la calidad de la carcasa.

2.1 Experimentos de digestibilidad

2.1.1 Estanques de cultivo

Para los estudios de digestibilidad se utilizaron 12 estanques de fibra de vidrio de forma cilindro-cónica de 0,5m^3 cada uno, con una columna de acrílico de 60cm de largo y 100mm de diámetro para la decantación y recolección de heces, la cual termina con una conexión con hilo para fijar un tubo de centrífuga de 50ml (Figura 1). La circulación del agua de cada estanque era de circuito abierto y la tasa de cambio se ajustó a 0,5/hora, de manera de disminuir al máximo la dilución y/o pérdida de heces y maximizar la óptima recolección. La temperatura del agua durante la colección de heces osciló entre 13–15ºC como promedio. Todos los estanques se mantuvieron con aireación continua y conectada a un sistema automático de oxigenación en la eventualidad de un corte de suministro de agua.

Figura 1. Estanques utilizados en los bioensayos de digestibilidad, tanto para evaluar las materias primas como las dietas experimentales.

2.1.2 Incorporación de marcador inerte

Para evaluar la digestibilidad de todas dietas estudiadas, el Cr_2O_3 fue incorporado junto con el aceitado del alimento a razón de 1%. El aceite fue mezclado con la cantidad de óxido de cromo necesaria, luego esta mezcla se juntó con el pellet seco en la tolva de aceitador al vacío y se aplicó una presión negativa de 150mb. La Figura 2 muestra el resultado final de la incorporación de óxido de cromo en las dietas.

Figura 2. Alimento con incorporación de 1% de óxido de cromo (Cr_2O_3).

2.1.3 Digestibilidad de la materia prima

Para evaluar la digestibilidad de la materia prima (harina de *Lupinus albus* con y sin tratamiento) se utilizó una modificación del método desarrollado por Bureau et al. (1999), que consiste en determinar la digestibilidad de una dieta estándar o de referencia (Tabla 1). Posteriormente, se determina la digestibilidad de una dieta compuesta de 70% de la dieta referencia y 30% de la materia prima a evaluar. Finalmente, mediante la aplicación de una ecuación matemática (descritas más adelante) se obtiene el coeficiente de digestibilidad aparente de la materia prima.

Tabla 1. Formulación de dieta de referencia utilizada en la evaluación de la digestibilidad de una materia prima.

Ingredientes	**%**
Harina de pescado	30
Harina de soya	17
Gluten de maíz	13
Harina de trigo	27
Premix vitamínico[1]	1
Premix minerales[1]	1
Aceite de pescado	10
Cr_2O_3	1

[1]Premix BIOMAR.

2.1.4 Alimentación y colección de heces

Para colectar una cantidad adecuada de heces, en cada estanque se distribuyeron al azar entre 40 y 45 peces de 60g de peso promedio, de manera de alcanzar una densidad promedio de 2,5Kg/m^3. Se aplicó un ayuno de 1 día antes de suministrar la dieta a evaluar, la cual fue suministrada hasta observar una ingesta adecuada antes de comenzar a recoger las heces, esto con el propósito de mantener un tránsito intestinal uniforme de la dieta con indicador.

Los tratamientos se ensayaron por triplicado, la alimentación fue manual a saciedad aparente, los siete días de la semana dos veces por día. Después de la última alimentación, se abren las llaves de las columnas de decantación de los estanques con el fin de limpiar todo el sistema y dejarlo libre de residuos de alimento y heces. Luego son instalados los tubos de recolección de heces, los cuales son retirados a la mañana siguiente. Las heces recolectadas, son centrifugadas (Eppendorf, modelo 5403) durante 20 minutos a 4200 rpm (Bureau y Cho, 2005), luego se elimina el sobrenadante para envasarlas y conservarlas en un "freezer". Este

procedimiento fue repetido diariamente hasta recolectar las cantidades suficientes de heces para realizar los análisis.

2.1.5 Ecuaciones para el cálculo de digestibilidad

Determinación de Coeficientes de Digestibilidad Aparente: para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) se utilizó un método de determinación indirecto con Cr_2O_3 (1,0%) (De la Higuera *et al.*, 1988).

$$CDA_{total}\,(\%) = 100 - \left(100 \times \frac{Cr_2O_3 \text{ en dieta (\%)}}{Cr_2O_3 \text{ en heces (\%)}}\right)$$

$$CDA_{nutrientes}\,(\%) = 100 - \left(100 \times \frac{\text{Nutriente en heces (\%)}}{\text{Nutriente en dieta (\%)}} \times \frac{Cr_2O_3 \text{ en dieta (\%)}}{Cr_2O_3 \text{ en heces (\%)}}\right)$$

Determinación de CDAs para la materia prima: para la determinación de estos parámetros se utilizó las ecuaciones descritas de Bureau y Cho (1999):

$$CDA_{total} = CDA\ D_{test} - 0{,}7 \times CDA\ D_{ref} / \ 0{,}3$$

$$CDA_{nutrientes}\,(\%) = \frac{Nut\ D_{test} \times CDA\ Nut\ D_{test} - 0{,}7 \times Nut\ D_{ref} \times CDA\ Nut\ D_{ref}}{0{,}3 \times Nut_{ing}}$$

Donde:

CDA_{total}: coeficiente de digestibilidad aparente total o de la materia seca

$CDA_{nutrientes}$: coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente

$CDA\ D_{test}$: coeficiente de digestibilidad aparente total de la dieta test (70:30)

$CDA\ D_{ref}$: coeficiente de digestibilidad aparente total de la dieta de referencia

$Nut\ D_{test}$: % del nutriente en la dieta test

$CDA\ Nut\ D_{test}$: coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta test

$Nut\ D_{ref}$: % del nutriente en la dieta de referencia

$CDA\ Nut\ D_{ref}$: coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta de referencia

Nut_{ing}: % del nutriente en el ingrediente

2.2 Experimentos de crecimiento

2.2.1 Condiciones de cultivo

Los bioensayos de crecimiento se realizaron en la estación experimental Piscicultura Los Laureles. Se ocuparon 12 estanques de fibra de vidrio circulares de 0,5m^3 (capacidad útil) cubiertos con una tapa cónica del mismo material con un orificio para la alimentación de 20 x 40 cm (Figura 3). La alimentación de agua de cada estanque era por gravedad con una tasa de cambio de 1,5/hora, oxígeno disuelto promedio de 9.7 $\pm$ 0.2 mg/l y una temperatura promedio de 14,5 $\pm$ 2,4°C.

Figura 3. Estanques de 500 litros utilizados para el bioensayo de crecimiento en la Piscicultura los Laureles.

Todas las dietas fueron ensayados por triplicado, la alimentación siempre fue manual a saciedad aparente los siete días de la semana dos veces por día, en la mañana de 9 a 10^{30} h y en la tarde de 18 a 19^{30} h. Diariamente se controló los gramos de alimento entregados por estanque y la mortalidad.

En todos los experimentos se realizó un muestreo mensual durante los bioensayos de crecimiento, donde se registro el peso total y la longitud total. Para el muestreo se utilizó una balanza marca Sartorius (modelo PT 500) de 0,01 g de precisión y un ictíometro de 0,1 cm de precisión. Para facilitar el manejo de los peces estos fueron sedados con el anestésico BZ-20 de Veterquímica (10 a 20ml por 100L de agua). Para la recuperación de los peces se aumentó el flujo de agua y la aireación en los estanques. Los muestreos se realizaron tras 24 h de ayuno.

2.2.2 Parámetros productivos evaluados

Crecimiento y sobrevivencia

Al término del experimento, se valoró la sobrevivencia y el crecimiento en peso en cada estanque, también se evaluó el incremento en biomasa, el porcentaje de crecimiento diario (*SGR*) a través de la ecuación de Ricker (1975) y el crecimiento por unidad térmica (*TGC*) (Bureau y Cho, 2005).

$$\textit{Incremento en Peso} = \textit{Peso final} - \textit{Peso inicial}$$

$$\%\ \textit{Crecimiento diario (SGR)} = \frac{100 \times (\ln \textit{Peso final} - \ln \textit{Peso inicial})}{t\ (\textit{Días})}$$

$$\textit{TGC (Crecimiento por unidad térmica)} = \frac{(\textit{Peso final}^{1/3} - \textit{Peso inicial}^{1/3}) \times 1000}{T\ (^{o}C) \times t\ (\textit{días})}$$

$$\%\ \textit{sobrevivencia} = \frac{N°\ \textit{final de peces}}{N°\ \textit{inicial de peces}} \times 100$$

Efectividad del Alimento

Al término de los experimentos de crecimiento se evaluó la efectividad del alimento mediante los siguientes parámetros:

Factor de Conversión del Alimento (FCR): que corresponde a la relación entre el alimento entregado (g) y el peso húmedo ganado (g).

$$FCR = \frac{\text{Alimento entregado (g)}}{\text{Ganancia en peso (g)}}$$

Eficiencia del Factor de Conversión (FE): que corresponde a la relación entre el peso corporal ganado (g peso húmedo) por alimento seco entregado expresado como porcentaje.

$$FE = \frac{\text{Incremento en peso (g)} \times 100}{\text{Alimento entregado (g)}}$$

2.2.3 Parámetros fisiológicos evaluados

Tasa de Eficiencia Proteica (PER): se define como la relación entre el peso corporal ganado (g peso húmedo) por proteína ingerida (g) y representa una medida de la habilidad del pez para utilizar la proteína dietaria. Este índice es el método más utilizado para determinar la calidad de la proteína en el crecimiento animal. En este estudio se utilizó la cantidad de proteínas suministradas y no las consumidas.

$$PER = \frac{\text{Ganancia en Peso corporal (g)}}{\text{Cantidad de Proteína suministradas (g)}}$$

*Valor Productivo de la Proteína (PPV)***:** Se define como la relación porcentual entre la ganancia de nitrógeno corporal y nitrógeno ingerido por el pez. En este caso se trabajó con nitrógeno suministrado.

$$PPV = \frac{\text{N corporal final} - \text{N corporal inicial} \times 100}{\text{N total suministrado (g)}}$$

*Índice de condición (K)***:** Está basado en la premisa que el peso es proporcional a la talla al cubo; si K < 1 el pez está en una pobre condición, si K= 1 el pez está en buena condición y si K > 1 el pez aparece con acumulación de grasa.

$$K = \frac{Peso\ (g)}{Talla\ (cm)^3} \times 100$$

Retención Energética (%): La retención energética (RE) se define como la relación porcentual entre la ganancia de energía corporal y la energía ingerida por el pez.

$$RE = \frac{Energía\ corporal\ final - Energía\ corporal\ inicial}{Energía\ ingerida\ (KJ)} \times 100$$

2.3 Análisis químicos

2.3.1 Análisis proximal

Se realizó análisis proximal de dietas, heces y carcasa de los peces en estudio. Todos los análisis fueron realizados en triplicado según las técnicas descritas por AOAC (1995).

Humedad: la humedad de las muestras se determinó por desecación en estufa a 105ºC hasta peso constante.

$$\%\ Materia\ seca = \frac{Masa\ muestra\ seca\ 105°C}{Masa\ inicial\ muestra} \times 100$$

$$\%\ Humedad = 100 - \%\ Materia\ seca$$

Cenizas: fue determinado mediante calcinación de la muestra en horno mufla a 550°C por tres horas, hasta obtener masa constante.

$$\%\ Cenizas\ totales = \frac{Masa\ final}{Masa\ inicial} \times 100$$

Proteínas: el contenido de proteínas (%N x 6,25) se determinó a partir de la composición del nitrógeno total de las muestras, mediante la técnica de Kjeldhal. El método consistió en la digestión de las muestras con ácido

sulfúrico concentrado a 400ºC a la que se adicionó un catalizador. Seguido de una destilación con Na(OH) al 40% en presencia de una solución indicadora con ácido bórico al 4%. Por último se realizó una titulación con HCl 0,1 N.

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(\text{Valor ml} - \text{Valor medida patrón ml}) \times 0{,}1 \times 14{,}004 \times 6{,}25}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$

Lípidos: El contenido de lípidos totales de la muestra se determinó mediante el método de extracción en caliente de grasa, con equipo Soxhlet usando éter de petróleo (40–60º).

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{\text{Masa muestra final}}{\text{Masa muestra inicial}} \times 100$$

Fibra: el contenido de fibra se determinó mediante una digestión ácida de las muestras desgrasadas con H_2SO_4, seguida de una digestión básica con NaOH. A continuación se secó el residuo obtenido en una estufa a 105ºC hasta peso constante, se pesó y calcinó a 550ºC durante 30 minutos en mufla. Finalmente se pesó el residuo restante.

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{Peso muestra seca 105ºC} - \text{Peso muestra calcinada 550ºC}}{\text{Peso de la muestra desgrasada}} \times 100$$

Extracto no nitrogenado (NFE): el contenido del extracto no nitrogenado se determinó por la diferencia de 100 menos la suma de los demás nutrientes.

2.3.2 Análisis de cromo

Determinación del óxido de cromo (Cr_2O_3): el porcentaje de óxido de cromo contenido en las muestras de alimento y heces se determinó mediante digestión de las mismas con ácido nítrico y perclórico concentrados, evaluando en espectrofotómetro a 550 nm la coloración

amarilla obtenida como consecuencia de la solubilización del cromo (AOAC, 1995).

2.3.3 Análisis de aminoácidos

Se determinó el perfil de aminoácidos en las dietas experimentales con diferentes niveles de incorporación de lupino (*L. albus*). Las muestras de las diferentes dietas fueron molidas con un procesador de alimento (Moulinex, modelo D56) a un tamaño de partícula de 300µm, luego fueron dispuestas en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas. Los análisis fueron realizados en el laboratorio analítico de nutrición animal de Degussa (Alemania). Los resultados son entregados como aminoácidos (g/100g de muestra) del contenido total después de la hidrólisis de las proteínas.

2.3.4 Análisis de ácidos grasos

Lípidos totales: Para todas las muestras se aplicó el método de Folch *et al*. (1957). Este método consiste en homogeneizar la muestra en un mezcla cloroformo/ metanol (2:1,v/v), y luego centrifugar a 3500 rpm en una centrífuga refrigerada marca Ependorf, modelo 4303, para separar la fase hidrosoluble y orgánica. La fase orgánica queda retenida en el cloroformo y la hidrosoluble en el metanol. Luego de separar la fase orgánica , se evapora el cloroformo con la ayuda de un minievaporador Una vez pesados los extractos lipídicos disueltos en el cloroformo, son guardados a –80°C hasta la preparación para el análisis de los ácidos grasos. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado con el propósito de reducir el error analítico, excepto en aquellas muestras en que la cantidad de muestra lo impidió. La cantidad de lípidos totales presente en cada muestra se expresó como porcentaje de su peso seco y se calculó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\%Lípidos\ en\ base\ seca\ (L.p.s.) = \frac{\%Lípidos\ en\ peso\ fresco}{\%\ Peso\ seco\ muestra} \times 100$$

Ácidos grasos: Una vez obtenidas los lípidos totales se procedió a preparar los ésteres metílicos de acuerdo a la metodología propuesta por Morrison y Smith (1964). La identificación de ácidos grasos se realizó por separación en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 serie II Plus, equipado con una columna marca JW-FFAP. El estándar utilizado fue un GLC 462 de Nu-Chek, utilizando como gas transportador Helio. Los ácidos grasos son expresados como porcentaje de los lípidos totales (en base seca) del total de ácidos grasos identificados.

2.3.5 Análisis energético

Determinación de energía bruta: la energía bruta de las dietas y heces fue determinada mediante el cálculo indirecto del valor calórico aportado por la completa combustión de proteínas, lípidos y carbohidratos de las dietas que corresponden a 23,6; 39,5 y 17,2 kj/g respectivamente (De la Higuera *et al.*, 1988).

Determinación de energía digestible: de acuerdo a De la Higuera *et al.* (1988), para el cálculo de energía digestible del alimento se utilizaron los valores de digestibilidad del alimento, la composición proximal del alimento y los valores calóricos estándar de cada macro nutriente.

$$ED = (g\ proteína\ cruda \times \%\ digestibilidad \times 23{,}6\ Kj/g) + (g\ lípidos \times \%\ digestibilidad \times 39{,}5\ Kj/g) + (g\ carbohidratos \times \%\ digestibilidad \times 17{,}2\ Kj/g).$$

Relación proteína digestible y energía digestible: para este cálculo se utilizaron los valores de digestibilidad de las proteínas y la energía digestible de cada dieta (De la Higuera *et al.*, 1988).

$$PD/ED = g\ proteína\ digestible\ /\ Energía\ digestible\ (Mj).$$

2.3.6 Análisis de carcasa

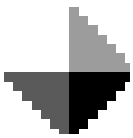
Para el análisis de la composición corporal de los peces, se analizó un pool de 10 peces tomados al azar al inicio de la experimentación y 10 por réplica al finalizar el período experimental con sobredosis de anestésico (BZ-20 de Veterquímica). En el laboratorio se clasificaron e identificaron las muestras de músculo por cada tratamiento. Luego de un secado a 65°C por 48 h, se trituraron las muestras hasta que se obtuvo una harina fina, la que fue envasada y mantenida en un freezer a –20°C hasta su análisis proximal.

2.3.7 Análisis de fósforo

Con el propósito de medir la retención del fósforo se evaluó este elemento en las heces y en las dietas testadas. Muestras de heces y alimentos fueron calcinadas y se determinó el fósforo por colorimetría del fosfo-vanado-molíbdico en un espectrofómetro UV Unicam (modelo HEλIOS-β). (Met. 965.17 AOAC, 1995)

2.4 Tratamientos estadísticos

Los datos obtenidos fueron comparados a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA), y las diferencias entre medias se compararon utilizando el test de Tukey con un intervalo de confianza del 95% ($P<0,05$). Previo a la aplicación de la anova se verificó la homogeneidad de varianza. Para datos de porcentaje se aplicó la transformación arco coseno, donde $f(x) = Cosen^{-1} \sqrt{(1-X)}$ descrita por (Sokal y Rohlf, 1980). Todos los análisis estadístico fuero realizados con el software MS Statistica.



CAPÍTULO III:
Experimento 1

EFECTO DEL MICRONIZADO Y AUTOCLAVADO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LA HARINA DE LUPINO (*Lupinus albus*) ENTERA Y SIN CÁSCARA EN TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).

3.1 INTRODUCCIÓN

La producción exitosa de un alimento para peces, que contenga cada vez menos harina de pescado requiere de una cuidadosa información del valor nutritivo y económico de otras fuentes proteicas (Bureau *et al*., 1999; 2000). Los subproductos de animales han sido ampliamente utilizados como una fuente de económica proteína, sin embargo, actualmente su uso es limitado o evitado por su baja digestibilidad, calidad variable y algunos problemas asociados con la encefalopatía bovina espongiforme. Es así que las proteínas de origen vegetal surgen como una muy buena alternativa para la sustitución de fuentes proteicas animales, particularmente para la harina de pescado. Considerables investigaciones han sido emprendidas para identificar y evaluar fuentes alternativas al uso de harina de pescado en las dietas para especies acuícolas carnívoras (Hardy, 2006, Opstvedt *et al*., 2003 Refstie *et al*., 2001; Carter and Hauler, 2000; Storebakken *et al*., 2000b, 1998; Tacon, 1997a; Gomes *et al*., 1995; Robaina *et al*. 1995; Moyano *et al*., 1992).

Uno de principales inconvenientes de las plantas son los factores antinutricionales que poseen, entre otros, inhibidores de proteasas y complejos hidratos de carbonos (oligosacáridos), los cuales pueden afectar el crecimiento y utilización de los nutrientes en animales monogástricos incluyendo los peces (Francis *et al*., 2001; Tacon, 1997b). No obstante, de acuerdo a Pereira y Oliva-Teles (2004), la reciente selección de plantas con bajos niveles de factores antinutricionales o la aplicación de adecuados

tratamientos tecnológicos tales como el descascarado, procesamiento con calor o humedad, pueden inactivar y remover la mayoría de los factores antinutricionales presentes en fuentes de vegetales proteicos. De acuerdo a Hardy (1996), las fuentes alternativas de proteínas para ser consideradas en las formulaciones para peces deben contener niveles de proteína sobre el 35%. Esto limita la potencial elección para apenas unos pocas materias primas como harina de soya, harina de canola, harina de lupino o concentrados de proteínas de estas mismas materias primas o de trigo o maíz. Por otra parte, las modernas dietas con alta densidad de nutrientes para especies acuáticas, tienen muy poca flexibilidad de formulación para acomodar gran cantidad de contenidos no nutricionales tales como carbohidratos complejos (oligosacáridos y fibra) y cenizas, también presentes en los vegetales. El grado de procesamiento de los ingredientes vegetales es conocido como un importante reductor de varios FANs (Factores Anti-Nutricionales), así como del mejoramiento de la disponibilidad del almidón para los peces. Esto ha sido verificado por varios autores (Gomes *et al*., 1993; Francis *et al*., 2001; Glencross *et al*., 2003b; Refstie *et al*. 2005).

Existen varias facetas claves para determinar la situación nutricional o el valor biológico de un ingrediente, lo principal es definir la proporción de nutrientes que un animal puede obtener de un ingrediente particular a través de sus procesos digestión y absorción. La determinación de la digestibilidad es el primer paso en la evaluación de ingredientes potenciales para uso en dietas de especies acuícolas (Bureau *et al*., 2000). Las pérdidas de material indigestible en las heces, es el factor primario en la valoración nutricional de un ingrediente. La digestibilidad aparente provee, en general, una buena indicación de la disponibilidad de energía y nutrientes de una materia prima, y entrega una base racional del material que puede ser utilizado para formular

una dieta que reúna estándares específicos de disponibilidad de los nutrientes.

Los valores de digestibilidad de la energía y de los nutrientes pueden ser fuertemente afectados por la naturaleza, composición y tratamiento realizado a una materia prima en particular. Así por ejemplo, la digestibilidad de la materia seca y de la energía para las leguminosas es usualmente mejorada cuando la cáscara y otros componentes carbohidratados son removidos (Allan y Booth, 2004). Thiessen *et al*. (2003) mostraron que la molienda, el descascarado, la presión de cocción o autoclavado y la extrusión incrementa la digestibilidad de la energía, proteína cruda y carbohidratos en soya, arvejas y habas en la trucha arco iris, mientras que Satoh *et al*. (1998) y Carter and Hauler (2000), comprobaron que el cocimiento por extrusión de la harina de canola mejoró su valor nutritivo para salmónidos. Otros efectos beneficiosos del procesamiento con calor pueden incluir la desactivación de los FANs, el incremento de la gelatinización del almidón y el incremento en la utilización del ENN y otros componentes (Bangoula *et al*., 1993; Burel *et al*. 2000a; Francis *et al*., 2001). La extrusión puede también conferir importantes beneficios para las características físico químicas del pellet, tal como aglutinación, estabilidad en el agua y flotabilidad (Hardy 1989). El calor moderado para los ingredientes ricos en proteínas puede ser beneficioso para el valor nutricional de los alimentos proteicos, el desdoblamiento de la proteína es con frecuencia más fácilmente digerido que las proteínas nativas. Según Sørensen *et al* (2002), la desnaturalización de las proteínas por el calor es la pérdida de la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de las proteína, mientras la estructura primaria permanece intacta, facilitando este hecho la utilización digestiva de las mismas.

Las microondas, otro método que produce calor, es ampliamente usado en la industria alimentaria para prolongar la conservación de los alimentos; este proceso que calienta selectivamente aquellas partes con mayor contenido de agua, produce un daño térmico mínimo y no produce cambios de color. Este proceso es conocido también como micronización, y es producido como energía electromagnética, transmitida por ondas que penetran en el alimento y se convierten en calor. Las microondas se producen en bandas de una frecuencia determinada (2.450Mhz), la profundidad de penetración en el alimento depende de esta frecuencia (Fellows, 2007). Debido al proceso de calentamiento interno, se causa el rompimiento de la estructura de la célula, se mejora la digestibilidad del almidón, el rompimiento de células lipídicas y la destrucción de factores antinutricionales. Pereira y Oliva-Teles (2004) compararon harina de lupino crudo con harina de lupino micronizado en juveniles de *Sparus aurata*, encontrando que la inclusión del harina lupino micronizado en las dietas promovió significativamente el crecimiento respecto de la inclusión de lupino crudo.

El lupino (*Lupinus sp*) es considerado una de las legumbres con más alto potencial, como ingrediente alternativo a la harina de pescado, debido a su alto contenido de proteína entre 32–36% para la semilla entera y más de 39% para la semilla descascarada (Glencross y Hawkins, 2004; Farhangi y Carter, 2001; Burel *et al*., 2000a). Sin embargo, similar a otros fuentes proteicas vegetales, los lupinos también contienen una gran cantidad de carbohidratos, nutricionalmente, no útiles y más aún carbohidratos que influencian el valor nutricional de otros componentes nutricionalmente útiles (Francis *et al*., 2001; Glencross *et al*., 2003b). Glencross *et al*. (2005), encontraron que el nivel de procesamiento de las variedades de lupino y soya tienen una significativa mejora en la mayoría de los parámetros de la digestibilidad. Los mayores incrementos relativos de la digestibilidad de la materia seca, energía y

proteína fueron observados entre las harinas sin cáscaras y los concentrados de proteínas. La digestibilidad del fósforo de todos los productos de lupino fue más alta, en contraste con la digestibilidad de otros nutrientes que disminuyó con el incremento del nivel de procesamiento del lupino (Glencross *et al*., 2005).

Existen evidencias que la trucha y el salmón responden en forma diferente a los ingredientes. Refstie *et al*. (2000), examinaron la respuesta nutricional de trucha arco iris y salmón de Atlántico alimentados con harinas de soya y notaron que las dos especies respondían diferentemente a la inclusión de este ingrediente. Glencross *et al*. (2004a), estudiaron la digestibilidad de varios ingredientes con las dos especies, la digestibilidad de la materia orgánica y la energía de cada ingrediente fue ampliamente reflejo del contenido de proteína de cada ingrediente. La digestibilidad de la proteína fue generalmente consistente entre las dos especies de peces, sólo la harina de lupino sin cáscara tiene una digestibilidad significativamente más alta en *S. salar* que en trucha arco iris y el concentrado proteico de soya una digestibilidad más baja, para la primera especie. Una clara diferencia entre las dos especies fue su capacidad para digerir el fósforo de los ingredientes. En términos generales, la capacidad digestiva del salmón del Atlántico aparece con una respuesta más positiva para la ausencia de oligosacáridos que la trucha arco iris (Glencross *et al*., 2004a).

Escaso conocimiento existe del efecto del calor húmedo (autoclavado) y seco (micronizado) sobre la digestibilidad de harina de lupino en salmónidos. El objetivo de este capítulo es comparar el efecto del micronizado y autoclavado sobre la digestibilidad aparente de la harina de lupino cruda con y sin cáscara en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Ingredientes y preparación de dietas

Se utilizó harina de lupino (*Lupinus albus*) variedad Hamburgo, se evaluó harina cruda con cáscara, harina cruda sin cáscara: la harina cruda sin cáscara fue tratadas también con calor seco y con calor húmedo, en diferentes tiempos de exposición. Todas las harinas fueron preparadas a partir de semillas molidas en un molino de piedra artesanal accionado por un motor de 0,5 HP, luego fueron tamizadas hasta alcanzar un tamaño de partículas de 300 µm. El tratamiento con calor húmedo se realizó en una olla a presión (Magefesa 5l), consistió en una cocción con vapor saturado por periodo de 15 y 45 minutos. La harina de lupino fue puesta en una bolsa de algodón sobre una rejilla de acero inoxidable para evitar el contacto directo con el agua, el nivel de agua de la olla estuvo 3cm bajo la rejilla. La olla se colocó con agua recién hervida sobre una cocina a gas a fuego alto, el tiempo de exposición de la harina de lupino al calor húmedo se consideró desde el momento que el vapor comenzó a liberarse a través de la válvula. Pasado el tiempo de exposición al vapor, la harina fue puesta a secar en una estufa WTC Binder por 24 h a 65 ºC. El tratamiento de la harina de lupino cruda con calor seco (micronización) se realizó en un horno microondas (Teka, modelo TMW17, 750W, 2450MHz), el tratamiento consistió en una exposición de 30seg en potencia baja (375W) y 30seg potencia alta (750W). La harina de lupino fue puesta sobre un plato de cerámica en una capa de 1cm aproximadamente en porciones de 200g, se repitió la operación hasta irradiar la cantidad necesaria de cada harina. La composición y fuente de todos los ingredientes usados se presentan en la Tabla 1

Tabla 1. Composición de nutrientes de los ingredientes experimentales, todos los valores se expresan porcentaje (%) excepto los indicados.

Nutrientes	[a] Harina pescado	[b] Harina soya	[c] Gluten maíz	[d] Harina trigo	[e] LCC	[f] LC	[g] LC15	[h] LC45	[i] LM30b	[j] LM30a
Materia Seca	89,42	90,72	91,28	87,03	87,68	89,40	95,39	95,78	89,80	90,81
Proteína bruta	72,81	53,51	69,50	11,66	31,13	41,63	41,19	41,19	41,52	40,96
Grasa bruta	8,78	0,48	2,15	0,38	4,04	10,30	11,76	11,31	9,56	9,91
E.N.N.	2,60	38,04	25,88	85,50	47,78	38,26	37,50	37,93	39,17	38,99
Fibra total	0,40	1,13	1,15	1,50	13,42	5,67	5,47	5,47	5,75	6,15
Cenizas totales	15,41	6,84	1,31	0,96	3,63	4,14	4,08	4,10	4,00	4,00
Nitrógeno	11,64	8,56	11,12	1,84	4,98	6,66	6,59	6,59	6,64	6,55
Fósforo	1,7	0,76	0,27	0,44	0,38	0,50	0,54	0,55	0,48	0,49

[a]Harina de pescado chilena, secada al vapor (Exapesca S.A., Talcahuano, Chile). [b]Sub-productos de la industría de extracción de aceite de soya (Importado por Terramar Chile S.A., Santiago, Chile). [c]Sub productos de la industria de almidón y aceites de maíz (Graneles Chile S.A. Santiago, Chile). [d]Molinera del Norte S. A., Chile. Lupino blanco var. Hamburgo (Sel Chile S.A. Temuco, Chile), total alkaloid 0,012%.[e]Harina de lupino con cáscara. [f]Harina lupino sin cáscara. [g]Harina lupino sin cáscara sometida a 15 minutos de calor húmedo. [h]Harina lupino sin cáscara sometida a 45 minutos de calor húmedo. [i]Harina lupino sin cáscara sometida a 30 segundos de micronización en baja potencia. [j]Harina lupino sin cáscara sometida a 30 segundos de micronización de alta potencia. Todos los datos son entregados en base a materia seca.

Para evaluar la digestibilidad de la harina de lupino tratada por los diferentes métodos físicos descritos anteriormente, se utilizó el método de descrito por Bureau y Cho (1999). Este consiste en evaluar la digestibilidad de una dieta estándar o de referencia y la digestibilidad de otra dieta constituida por el 70% de la dieta estándar y 30% del ingrediente que se quiere testar. Para esto la dieta basal fue formulada y preparada para contener un 47% de proteína bruta y aproximadamente un 13% de grasa bruta, además de 1% de un marcador inerte (Cr_20_3) (Tabla 2). Se preparo una mezcla basal para todas las dietas experimentales, el ingrediente en estudio (harina de lupino tratada con diferentes medios físicos) para cada dieta experimental se incorporó a razón de 30% (Tabla 2).

Las dietas fueron procesadas mezclando los ingredientes secos, excepto la harina de trigo, durante 30min en una mezcladora Kitchen Aid modelo K5SS. La harina de trigo fue gelatinizada mezclándola con agua (30% del total de los ingredientes secos) y sometiéndola a un proceso de hervor por 15min aproximadamente. La harina gelatinizada se dejó enfriar y luego fue mezclada

con el aceite de pescado. La mezcla húmeda y la mezcla de ingrediente secos fue convenientemente mezclada por 30min en una mezcladora Kitchenaid. Posteriormente, la masa obtenida fue pelletizada en una máquina RCA de 1 HP con una matriz con orificios de 3mm. Los pellets húmedos fueron secados en un horno WTC, Binder por 24 h a 65 ºC. Posteriormente las dietas experimentales fueron almacenadas en bolsas de polietileno y almacenadas bajo refrigeración a -18°C. La dieta de referencia fue preparada en una forma similar, pero sin la adición de los ingredientes a testar. La formulación y composición proximal de las dietas experimentales y la dieta de referencia son presentadas en la Tabla 2.

3.2.2 Condiciones experimentales y recolección de heces

Se trabajó con juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de peso promedio de 61,3±3,1 g, provenientes de la piscicultura “Los Laureles”, perteneciente a la Universidad Católica de Temuco. La descripción de los estanques, las condiciones de cultivo, la metodología de alimentación, de recolección de heces y de análisis químicos, así como las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la digestibilidad aparente de dietas y materias primas se describe en el capítulo II de esta tesis, Material y Métodos.

3.2.3 Análisis estadísticos

Todas las dietas fueron ensayadas en triplicado y los valores analizados corresponden a la media de los distintos tratamientos. Se analizó la homogeneidad de los datos usando el Test de Cochran. El efecto del ingrediente sobre la digestibilidad de la materia seca, nitrógeno, energía y extracto no nitrogenado en cada dieta fueron examinados por un ANOVA de

dos vías, teniendo como factores la especie y el ingrediente. Los niveles de significancia a posteriori fueron determinados mediante el Test de Tukey. El nivel de significancia crítico para todos los análisis fue establecido en P<0,05.

Tabla 2. Formulación y composición de nutrientes de las dietas experimentales, todos los valores se expresan porcentaje (%) excepto los indicados. La composición proximal de las dietas se entrega en porcentaje de base seca.

	Dieta Referencia	**Dieta 1**	**Dieta 2**	**Dieta 3**	**Dieta 4**	**Dieta 5**	**Dieta 6**
Formulación de las dietas							
Harina de pescado	33	23,1	23,1	23,1	23,1	23,1	23,1
Harina de soya	17	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9
Gluten de maíz	13	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1
Harina de trigo	24	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7
Aceite pescado	10	7	7	7	7	7	7
[a]Harina Lupino c/c	0	30	0	0	0	0	0
[b]Harina Lupino s/c	0	0	30	0	0	0	0
[c]Harina Lupino s/c 15'CH	0	0	0	30	0	0	0
[d]Harina Lupino s/c 45'CH	0	0	0	0	30	0	0
[e]Harina Lupino s/c 30''Mb	0	0	0	0	0	30	0
[f]Harina Lupino s/c 30''Ma	0	0	0	0	0	0	30
Premix vitamínico Biomar	1	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Premix mineral Biomar	1	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Indicador (Cr_2O_3)	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Contenido de nutrientes en dietas (%)							
Materia Seca	94,63	90,60	90,21	93,84	93,24	97,02	95,24
Proteína bruta	47,02	36,87	46,95	45,15	46,80	46,41	45,53
Grasa bruta	12,88	11,37	12,32	12,68	11,39	11,47	12,17
Extracto no nitrogenado	28,73	37,82	31,15	32,72	32,52	33,06	33,11
Fibra bruta	0,95	5,39	1,40	1,36	1,32	1,22	1,30
Cenizas totales	10,41	8,56	8,18	8,09	7,97	7,84	7,89
Energía bruta (Mj/Kg MS)	21,13	19,69	21,30	21,29	21,14	21,17	21,25
Nitrógeno	7,52	5,90	7,51	7,22	7,49	7,43	7,28
Fósforo	1,21	0,94	0,99	1,03	0,98	1,00	0,94

[a]Harina de lupino con cáscara. [b]Harina lupino sin cáscara. [c]Harina lupino sin cáscara sometida a 15 minutos de calor húmedo. [d]Harina lupino sin cáscara sometida a 45 minutos de calor húmedo. [e]Harina lupino sin cáscara sometida a 30 segundos micronización de baja potencia. [f]Harina lupino sin cáscara sometida a 30 segundos micronización de a potencia.

3.3 RESULTADOS

La harina de lupino cruda sin cáscara sometida a los diferentes tratamientos térmicos no presentó una alteración significativa en su composición proximal (Tabla 1). Las proteínas en promedio alcanzaron un 41,22±0,26%, el extracto etéreo 10,63±0,93%, la fibra total 5,71±0,27%, cenizas totales 4,05±0,06 y el extracto no nitrogenado 38,39±0,70. El coeficiente de variación (CV) entre la harina de lupino sin tratamiento y la harina sometida a los distintos tratamientos térmicos no supero el 3% en la composición de los principales nutrientes, excepto con el extracto etéreo alcanzó un CV 9,3% con el lupino LC15 y 6,6% con el lupino LC45, lo mismo ocurrió con el nivel de fósforo que alcanzó un CV de 7,44% con el lupino LC45 y 6,10% con el lupino LC15. La harina de lupino con cáscara presentó una composición proximal significativamente diferente con la harina de lupino descascarada, los porcentajes de proteína, extracto etéreo y cenizas totales disminuyeron 10, 6 y 0,5% respectivamente; mientras que la fibra bruta y el extracto no nitrogenado (ENN) aumentaron en 8,7% y 11,5%, respectivamente (Tabla 1).

La composición proximal de las distintas dietas evaluadas con inclusión de 30% de harina de lupino con y sin tratamiento térmico (Tabla 2), fueron estadísticamente similares, con excepción de la dieta 2 con inclusión de harina de lupino con cáscara donde el porcentaje de proteína, extracto etéreo y energía disminuyeron 10%; 1,0% y 1,61Mj/kg, respectivamente, en tanto que el ENN, la fibra bruta y las cenizas totales aumentaron aproximadamente en 6,6; 4,0 y 0,4%, respectivamente. Indudablemente, el cambio en la composición proximal de esta dieta está influenciado por la presencia de la cáscara en la harina de lupino.

El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas, con inclusión de 30% de harina de lupino con y sin tratamiento térmico en el salmón del Atlántico y la trucha arco iris se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* alimentadas con dietas con inclusión de 30% de harina de lupino sometida a diferentes tratamientos térmicos.

Nutrientes	Dieta referencia	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
			trucha arcoiris (O. mykiss)				
Materia seca	85,3 ± 1,6	79,1 ± 1,4	82,0 ± 0,1	84,4 ± 1,4	83,9 ± 1,8	89,2 ± 1,0	86,8 ± 0,4
Proteína bruta	93,2 ± 1,0	91,1 ± 0,5	91,8 ± 0,4	96,0 ± 0,4	95,4 ± 0,5	96,3 ± 0,4	95,4 ± 0,1
Extracto etéreo	97,6 ± 0,3	97,5 ± 0,6	97,0 ± 0,4	99,4 ± 0,2	98,0 ± 0,6	98,5 ± 0,2	98,2 ± 0,1
E. N. N.	79,0 ± 2,8	73,1 ± 1,7	70,4 ± 0,8	73,2 ± 3,2	72,8 ± 3,1	80,7 ± 1,6	78,3 ± 0,6
Energía bruta	90,9 ± 0,8	86,6 ± 0,9	87,6 ± 0,1	90,8 ± 1,0	90,0 ± 1,2	92,6 ± 0,7	91,5 ± 0,1
Nitrógeno	93,2 ± 1,0	91,1 ± 0,5	91,8 ± 0,4	96,0 ± 0,4	95,4 ± 0,5	96,3 ± 0,4	95,4 ± 0,1
Fósforo total	78,9 ± 2,3	68,6 ± 2,3	67,9 ± 0,2	74,0 ± 2,4	71,3 ± 3,2	81,2 ± 1,8	75,4 ± 0,9
			salmón del Atlántico (S. salar)				
Materia seca	73,3 ± 3,8	72,6 ± 2,0	75,1 ± 0,1	79,8 ± 4,5	81,0 ± 1,9	78,5 ± 0,6	76,1 ± 1,0
Proteína bruta	88,8 ± 1,9	89,6 ± 0,6	92,2 ± 0,2	91,3 ± 1,9	92,1 ± 0,1	90,3 ± 0,8	89,3 ± 0,9
Extracto etéreo	97,2 ± 0,8	94,6 ± 0,4	96,5 ± 0,3	97,2 ± 1,6	97,6 ± 0,6	97,7 ± 1,2	96,8 ± 0,3
E. N. N.	50,1 ± 6,0	62,7 ± 3,4	52,5 ± 1,5	67,0 ± 8,3	69,9 ± 4,9	64,5 ± 1,2	60,4 ± 1,7
Energía bruta	81,7 ± 2,5	81,8 ± 1,2	83,2 ± 0,3	86,3 ± 3,5	87,4 ± 1,4	85,0 ± 0,7	83,2 ± 1,0
Nitrógeno	88,8 ± 1,9	89,6 ± 0,6	92,2 ± 0,2	91,3 ± 1,9	92,1 ± 0,1	90,3 ± 0,8	89,3 ± 0,9
Fósforo total	61,7 ± 5,4	65,6 ± 1,6	57,1 ± 1,5	68,2 ± 8,2	67,5 ± 2,3	66,1 ± 0,3	59,8 ± 2,9

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 3).

Al comparar mediante un análisis de varianza de dos vías el efecto de las distintas dietas en salmón y trucha, se constato que existen diferencias altamente significativas ($P<0,05$) entre el CDA total, de proteínas, de extracto etéreo, de extracto no nitrogenado, de energía y de fósforo de todas las dietas evaluadas, del mismo modo las respuestas en digestibilidad de ambas especies fue significativamente diferente entre ellas ($P<0,05$) y existe una interacción también significativa para cada valor de CDA entre dieta y especie (Tabla 4).

La comparación de medias a través del test de Tukey reveló respuestas de CDA significativas diferentes ($P<0,05$) entre la trucha y el salmón del atlántico

para las distintas dietas evaluadas. En general la digestibilidad aparente promedio para materia seca, proteína bruta, extracto etéreo, extracto no nitrogenado, nitrógeno y fósforo fue mayor en Salmón del Atlántico que en la trucha arco iris para las mismas dietas evaluadas (Tabla 5).

Tabla 4. Parámetros estadísticos de la ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias en respuesta del CDA por especie y para las dietas con inclusión de 30% de *Lupino Albus* sometido a diferentes tratamientos térmicos.

Variables independientes	CDA	Suma cuadrado	Grados libertad	Error Cuadrado medio	F	p
Especie	Materia seca	633,209	1	3,865	163,852	0,000
Dietas	Materia seca	44,977	6		11,639	0,000
Especie x dieta	Materia seca	17,653	6		4,568	0,002
Especie	Proteína	140,941	1	0,800	176,129	0,000
Dietas	Proteína	10,582	6		13,224	0,000
Especie x dieta	Proteína	8,690	6		10,859	0,000
Especie	Extracto etéreo	15,835	1	0,457	34,647	0,000
Dietas	Extracto etéreo	3,754	6		8,213	0,000
Especie x dieta	Extracto etéreo	1,488	6		3,255	0,015
Especie	E. N. Nitrogenado	2161,276	1	12,973	166,604	0,000
Dietas	E. N. Nitrogenado	93,483	6		7,206	0,000
Especie x dieta	E. N. Nitrogenado	112,843	6		8,699	0,000
Especie	Energía	365,194	1	1,965	185,875	0,000
Dietas	Energía	19,114	6		9,729	0,000
Especie x dieta	Energía	8,950	6		4,555	0,002
Especie	Nitrógeno	140,941	1	0,800	176,129	0,000
Dietas	Nitrógeno	10,582	6		13,224	0,000
Especie x dieta	Nitrógeno	8,690	6		10,859	0,000
Especie	Fósforo	1093,571	1	10,381	105,340	0,000
Dietas	Fósforo	75,538	6		7,276	0,000
Especie x dieta	Fósforo	53,976	6		5,199	0,001

Tabla 5. Comparación de medias mediante el test de Tukey. La especie como efecto principal en la evaluación de los CDA de dietas con inclusión de 30% de *Lupinus albus* sometido a diferentes tratamientos térmicos.

		Materia Seca		Proteína bruta		Extracto Etéreo		Extracto No Nitrogenado		Energía bruta		Nitrógeno		Fósforo	
		{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}
Media CDA		84,38	76,62	94,16	90,50	98,02	96,80	75,36	61,01	89,99	84,09	94,16	90,50	73,91	63,71
Trucha arcoiris	{1}		b		b		b		b		b		b		b
Salmón atlántico	{2}	a		A		a		a		A		a		a	

Letras “a” y “b” representan los grupos homogéneos, diferencias significativas con P<0,05.

La Tabla 6 muestra y compara a través del test de Tukey las respuestas medias de CDA para trucha arco iris y salmón del Atlántico en forma conjunta para las seis dietas evaluadas. En tanto, la Figura 1 se muestra la respuesta individual de los coeficientes de digestibilidad aparente total, de proteínas, de extracto etéreo, extracto no nitrogenado, de energía y del fósforo trucha arco iris y el salmón del Atlántico para las distintas dietas evaluadas.

Tabla 6. Comparación de medias mediante el test de Tukey. Se confronta las respuestas medias de CDA en *O. mykiss* y *S. salar* en forma conjunta para las siete dietas evaluadas.

CDA total			**CDA proteínas**			**CDA extracto etéreo**		
Especie y dieta	Media	Diferencia estadística	Especie y dieta	Media	Diferencia estadística	Especie y dieta	Media	Diferencia estadística
SA-Dieta 1	72,62	A	SA-Dieta 6	89,28	a	SA-Dieta 1	94,59	a
SA-Dieta 2	75,09	Ab	SA-Dieta 1	89,59	ab	SA-Dieta 2	96,47	ab
SA-Dieta 6	76,06	Abc	SA-Dieta 5	90,26	abc	SA-Dieta 6	96,76	bc
SA-Dieta 5	78,45	Bcd	TA-Dieta 1	91,08	abc	TA-Dieta 2	96,98	bc
TA -Dieta 1	79,08	Bcde	SA-Dieta 3	91,31	abc	SA-Dieta 3	97,21	bc
SA-Dieta 3	79,77	Bcdef	TA-Dieta 2	91,75	bc	TA-Dieta 1	97,53	bcd
SA-Dieta 4	80,97	Chef	SA-Dieta 4	92,12	c	SA-Dieta 4	97,63	bcd
TA-Dieta 2	82,01	Defg	SA-Dieta 2	92,16	c	SA-Dieta 5	97,73	bcd
TA-Dieta 4	83,89	Efg	TA-Dieta 4	95,39	d	TA-Dieta 4	97,99	bcd
TA-Dieta 3	84,41	Fgh	TA-Dieta 6	95,43	d	TA-Dieta 6	98,18	bcd
TA-Dieta 6	86,84	Gh	TA-Dieta 3	96,01	d	TA-Dieta 5	98,53	cd
TA-Dieta 5	89,17	H	TA-Dieta 5	96,27	d	TA-Dieta 3	99,37	d
CDA extracto no nitrogenado			**CDA energía**			**CDA fósforo**		
Especie y dieta	Media	Diferencia estadística	Especie y dieta	Media	Diferencia estadística	Especie y dieta	Media	Diferencia estadística
SA-Dieta 2	52,54	A	SA-Dieta 1	81,83	a	SA-Dieta 2	57,10	a
SA-Dieta 6	60,43	Ab	SA-Dieta 2	83,18	ab	SA-Dieta 6	59,76	ab
SA-Dieta 1	62,65	B	SA-Dieta 6	83,24	ab	SA-Dieta 1	65,57	abc
SA-Dieta 5	64,54	Bc	SA-Dieta 5	84,95	abc	SA-Dieta 5	66,09	bc
SA-Dieta 3	66,97	Bc	SA-Dieta 3	86,26	bcd	SA-Dieta 4	67,52	bcd
SA-Dieta 4	69,88	Bcd	TA-Dieta 1	86,63	bcd	TA-Dieta 2	67,93	bcd
TA-Dieta 2	70,38	Bcd	SA-Dieta 4	87,40	cde	SA-Dieta 3	68,21	bcd
TA-Dieta 4	72,79	Cde	TA-Dieta 2	87,57	cde	TA-Dieta 1	68,56	bcd
TA-Dieta 1	73,14	Cde	TA-Dieta 4	89,96	def	TA-Dieta 4	71,32	cd
TA-Dieta 3	73,19	Cde	TA-Dieta 3	90,77	ef	TA-Dieta 3	74,02	cde
TA-Dieta 6	78,28	de	TA-Dieta 6	91,46	f	TA-Dieta 6	75,40	de
TA-Dieta 5	80,73	e	TA-Dieta 5	92,58	f	TA-Dieta 5	81,22	e

TA= trucha arco iris y SA= salmón del Atlántico

La utilización digestiva total de *Salmo salar*, para la dieta con lupino crudo es significativamente menor (P<0,05) que en trucha arco iris. El CDA total de la dieta con lupino crudo con cáscara (Dieta 1) es estadísticamente más bajo (P<0,05) en salmón del Atlántico que en trucha arco iris, 72,6% y 79,0% respectivamente. La digestibilidad total en *S. salar* para las dietas con lupino crudo con cáscara (Dieta 1), crudo sin cáscara (Dieta 2) y micronizado en alta y baja potencia (Dietas 5 y 6) variaron entre 72,6 y 78,4% sin diferencias estadísticas entre ellas. La trucha arco iris mostró una mayor digestibilidad total para las dietas con lupino crudo sin cáscara (Dieta 2), lupino autoclavado (Dietas 3 y 4) y lupino micronizado en alta y baja potencia (Dietas 5 y 6), variando sus CDA entre 82,0 y 89,2%. Las dietas con lupino micronizado (Dietas 5 y 6) y lupino autoclavado (Dietas 3 y 4) no mostraron diferencias entre ellas para el CDA total en trucha arco iris (Tabla 6, Figura 1a).

Los diferentes tratamientos aplicados al lupino tuvieron un efecto significativo sobre la digestibilidad de las proteínas en las dietas testadas. La digestibilidad de las proteínas fue significativamente más alta en trucha arco iris que en salmón del Atlántico. Las dietas con harina de lupino micronizado en alta y baja potencia (Dietas 5 y 6), con harina cruda con cáscara (Dieta 1) y con harina autoclavada por 15 minutos (Dieta 3) no mostraron diferencias significativas (P>0,05) en la digestibilidad de proteínas en salmón del Atlántico y los valores variaron entre 88,78% y 91,31%. Sin embargo, la digestibilidad de proteínas en las dietas con harina de lupino autoclavada 45 y 15 min (Dietas 3 y 4) y micronizada en alta y baja potencia (Dietas 5 y 6) fueron significativamente más alta en trucha iris (95,39% a 96,27%) que en salmón del Atlántico, no mostrando diferencias significativas entre ellas (Tabla 6, Figura 1b).

La digestibilidad aparente de los lípidos en las dietas con harinas de lupino tratadas, no mostraron grandes diferencias entre la trucha arco iris y salmón del Atlántico. El valor más bajo del CDA de los lípidos se obtuvo con *S. salar* con la dieta con lupino crudo con cáscara (Dieta 1, 94,6%) y fue significativamente ($P<0,05$) menor que en trucha arco iris (Dieta 1, 97,5%) con la misma dieta. El CDA de los lípidos de las dietas con lupino micronizado en alta y baja potencia (Dietas 5 y 6) y autoclavado 45 min (Dieta 4) no mostraron diferencias significativas ($P>0,05$) entre la trucha arco iris y salmón del Atlántico, los valores variaron entre 96,76 y 98,53%. La digestibilidad de lípidos de la dieta con lupino autoclavado 15 min (Dieta 3) fue significativamente más alta en trucha arco iris (99,37%) que en salmón del Atlántico (97,2%) (Tabla 6, Figura 1c).

Los tratamientos aplicados a la harina de lupino tuvieron un marcado efecto en la digestibilidad de los carbohidratos de las dietas testadas entre la trucha arco iris y el salmón del Atlántico. La trucha arco iris mostró los valores más altos de CDA de los carbohidratos (70,4%, Dieta 2 a 80,7%, Dieta 5) en comparación con el salmón del Atlántico (52,5%, Dieta 2 a 69,9%, Dieta 4), siendo los segundos significativamente ($P<0,05$) más bajos que los primeros. La micronización y el autoclavado no mostraron un efecto significativo en la digestibilidad de los carbohidratos de las dietas testadas en trucha arco iris y salmón del Atlántico al analizarla cada especie por separado. Es decir, los valores de digestibilidad de las dietas con lupino crudo (Dieta 2) y lupino crudo con cáscara (Dieta 1) no se diferenciaron estadísticamente de las dietas con los lupinos tratados con calor seco por micronización (Dietas 5 y 6) y calor húmedo por autoclavado (Dietas 3 y 4) (Tabla 6, Figura 1d).

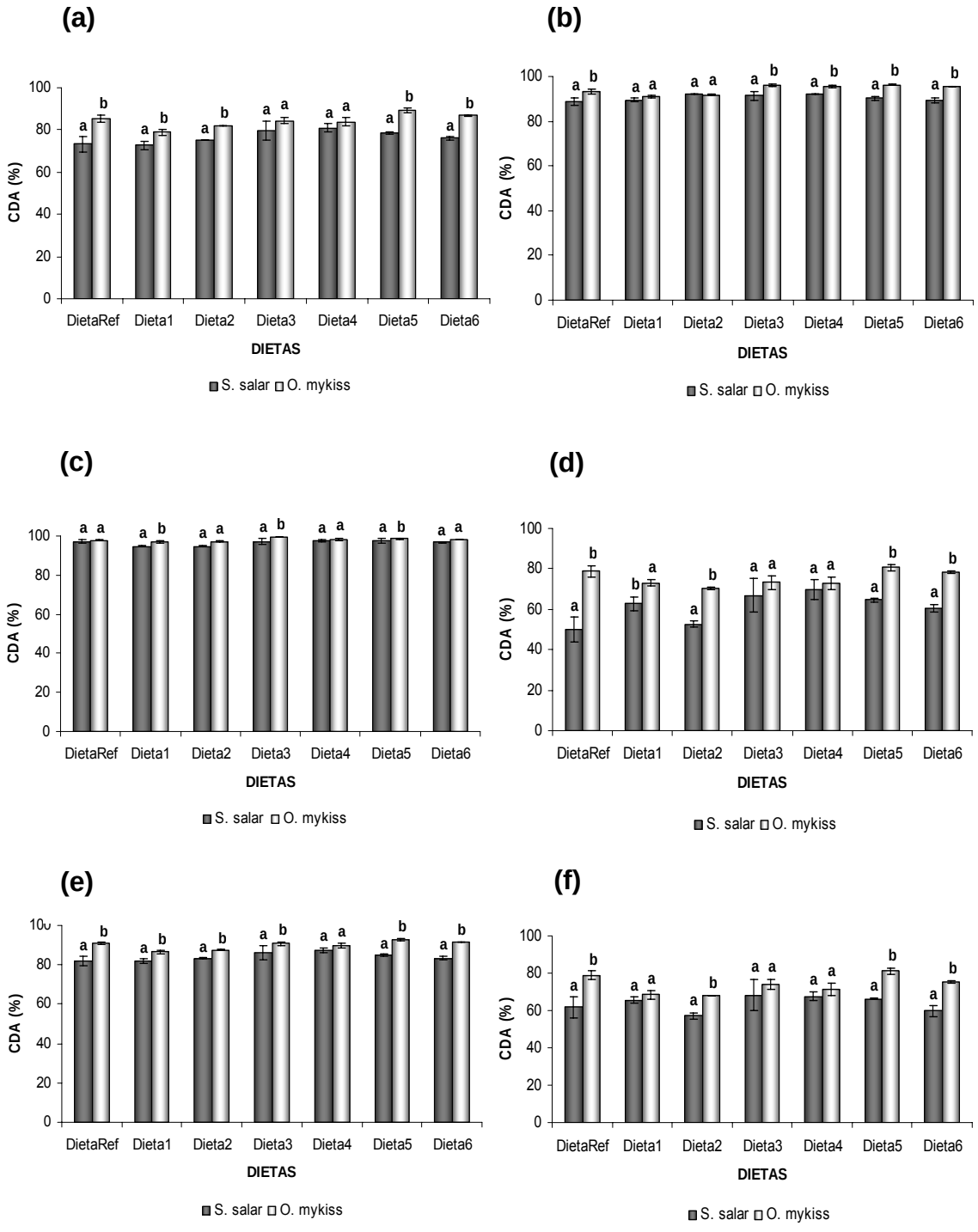


Figura 1. Digestibilidad aparente en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* alimentadas con dietas con 30% de inclusión de harina de *Lupinus albus* sometida a diferentes tratamientos de calor, **(a)** CDA de total, **(b)** CDA de proteína, **(c)** CDA de extracto etéreo, **(d)** CDA de los hidratos de carbono, **(e)** CDA de la energía y **(f)** CDA del fósforo.

Los diferentes tratamientos aplicados al lupino hicieron variar la digestibilidad de la energía de las dietas desde 81,75% a 92,58% en el salmón del Atlántico y trucha arco iris en su conjunto. Los valores más bajos variaron entre 81,83 y 84,95% para las dietas 1, 2, 5 y 6 testadas en salmón del Atlántico, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas (P>0,05). Los valores de digestibilidad de la energía más altos se alcanzaron con trucha arco iris para las dietas con lupino autoclavado en 15 min.(Dieta 3), lupino micronizado en alta y baja potencia (Dietas 6 y 5) cuyos valores variaron entre 89,96 y 92,58%, sin diferencias estadísticas entre ellas (P>0,05). La digestibilidad de la energía en trucha arco iris de este último grupo de dietas fue significativamente (P<0,05) más alta que la digestibilidad de la energía del primer grupo de dietas con salmón del Atlántico. La digestibilidad de la energía de las dietas con lupino micronizado en baja potencia (Dieta 5), lupino autoclavado 15 y 45 min (Dieta 3 y 4) en salmón del atlántico no se diferenció estadísticamente (P>0,05) del CDA de la energía de la dieta con lupino crudo (Dieta 2) en trucha arco iris (Tabla 6, Figura 1e).

Las digestibilidades más bajas para el fósforo se obtuvieron en las dietas con lupino tratado en salmón del Atlántico y los valores variaron entre 59,76% y 68,21%. El CDA del fósforo de las dietas con lupino crudo con cáscara (Dieta 1), lupino autoclavado en 15 y 45 min (Dietas 3 y 4) y lupino micronizado en baja y alta potencia (Dietas 5 y 6) en *Salmo salar* no se diferenciaron estadísticamente (P>0,05) del CDA del fósforo de la dieta con lupino con cáscara (Dieta 1) en *O. mykiss*. Las digestibilidades significativamente más altas para el fósforo se obtuvieron con la trucha arco iris para las Dietas 2, 5 y 6, con valores que variaron entre 74,02% y 81,22% pero sin diferencias entre ellas. El CDA del fósforo de la Dieta 4 (71,32%) no presentó diferencia significativa (P>0,05) con el CDA de la Dieta 3 (74,02%) en trucha arco iris (Tabla 6, Figura 1 f).

Tabla 7. Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) harina de lupino, *Lupinus albus*, sometida a diferentes tratamientos térmicos en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* alimentadas.

Nutrientes	Lupino crudo c/cáscara	Lupino crudo s/cáscara	Lupino autoclav. 15 min.	Lupino autoclav. 45 min.	Lupino micron. 700 W	Lupino micron. 1400 W
			trucha arcoiris (O. mykiss)			
Materia seca	64,7 ± 4,8	74,4 ± 0,3	82,5 ± 4,6	80,7 ± 5,9	97,6 ± 3,3	90,0 ± 1,4
Proteína bruta	31,0 ± 2,0	99,3 ± 1,5	89,2 ± 1,4	97,6 ± 1,6	96,0 ± 3,6	91,8 ± 2,4
Extracto etéreo	188,5 ± 6,0	78,6 ± 1,9	107,7 ± 0,9	68,0 ± 1,9	98,0 ± 4,4	93,2 ± 3,0
E. No Nitrogenado	82,2 ± 4,6	52,6 ± 2,1	71,7 ± 9,3	68,5 ± 8,9	90,8 ± 1,8	87,7 ± 0,6
Energía bruta	70,2 ± 3,4	84,8 ± 0,3	94,1 ± 3,5	89,6 ± 4,1	100,9 ± 2,3	99,1 ± 0,4
Nitrógeno	23,2 ± 2,0	93,4 ± 1,5	96,6 ± 1,6	107,1 ± 1,9	106,6 ± 1,5	97,9 ± 0,4
Fósforo total	19,2 ± 11,3	20,6 ± 1,0	56,1 ± 7,8	33,6 ± 3,0	91,7 ± 7,2	25,5 ± 0,7
			salmón del Atlántico (S. salar)			
Materia seca	70,9 ± 6,5	79,2 ± 0,3	94,8 ± 15,0	98,7 ± 6,2	90,4 ± 1,9	82,4 ± 3,3
Proteína bruta	40,7 ± 2,5	112,5 ± 0,9	97,1 ± 7,1	112,4 ± 0,2	101,7 ± 2,8	93,0 ± 3,3
Extracto etéreo	164,0 ± 3,5	100,9 ± 1,1	101,0 ± 5,7	69,4 ± 2,0	85,2 ± 4,8	101,3 ± 1,3
E. No Nitrogenado	95,1 ± 9,0	54,9 ± 4,0	105,3 ± 24,2	111,3 ± 14,1	95,9 ± 3,3	87,2 ± 5,0
Energía bruta	78,2 ± 4,8	91,7 ± 1,0	100,5 ± 11,8	102,8 ± 4,9	96,7 ± 2,3	92,7 ± 3,4
Nitrógeno	39,0 ± 2,5	111,2 ± 0,9	95,8 ± 7,1	111,1 ± 0,2	100,4 ± 2,8	91,6 ± 3,3
Fósforo total	119,1 ± 7,6	12,9 ± 9,0	153,8 ± 24,2	101,9 ± 1,9	83,1 ± 1,7	31,4 ± 0,7

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 3).

En la Tabla 7 se muestra los resultados de la digestibilidad aparente de la materia prima en *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo salar*, para las harinas de lupino cruda con y sin cáscara y sometida a los diferentes tratamientos térmicos. El análisis de varianza de dos vías para el CDA total, de proteínas, de EE, de ENN, de Energía y del fósforo, mostraron diferencias altamente significativas para el efecto especie y tratamiento térmico aplicado a la harina de lupino, así como para la interacción especie por tratamiento térmico del lupino (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros estadísticos de la ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias en respuesta del CDA por especie y por tratamiento térmico aplicado a la harina de *Lupino albus*.

Variables independientes	CDA	Suma cuadrado	Grados libertad	Error Cuadrado medio	F	p
Especie	Materia seca	175,949	1	34,418	5,112	0,033
Trat. Térmico Lupino (TTL)	Materia seca	567,331	5		16,483	0,000
Especie x TTL	Materia seca	159,418	5		4,632	0,004
Especie	Proteína	690,473	1	8,784	78,609	0,000
Trat. Térmico Lupino (TTL)	Proteína	4186,340	5		476,605	0,000
Especie x TTL	Proteína	37,270	5		4,243	0,007
Especie	Extracto etéreo	46,031	1	12,190	3,776	0,064
Trat. Térmico Lupino (TTL)	Extracto etéreo	8174,851	5		670,641	0,000
Especie x TTL	Extracto etéreo	403,006	5		33,061	0,000
Especie	E. N. N.	2307,549	1	92,850	24,852	0,000
Trat. Térmico Lupino (TTL)	E. N. N.	1308,666	5		14,094	0,000
Especie x TTL	E. N. N.	483,881	5		5,211	0,002
Especie	Energía	142,926	1	20,847	6,856	0,015
Trat. Térmico Lupino (TTL)	Energía	526,717	5		25,266	0,000
Especie x TTL	Energía	87,133	5		4,180	0,007
Especie	Nitrógeno	146,496	1	7,582	19,322	0,000
Trat. Térmico Lupino (TTL)	Nitrógeno	5073,837	5		669,217	0,000
Especie x TTL	Nitrógeno	167,792	5		22,131	0,000
Especie	Fósforo	16294,089	1	40,980	397,608	0,000
Trat. Térmico Lupino (TTL)	Fósforo	6893,434	5		168,214	0,000
Especie x TTL	Fósforo	4038,795	5		98,555	0,000

La comparación de medias a través del test de Tukey reveló CDA significativamente diferentes entre la trucha arco iris y el salmón del Atlántico para la harina de lupino sujeto a los diferentes tratamientos térmicos. En general la digestibilidad aparente promedio para materia seca, proteína bruta, extracto etéreo, extracto no nitrogenado y fósforo fue mayor en la trucha arco iris que en el salmón del Atlántico (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de medias mediante el test de Tukey. Considerando la especie como efecto principal en la evaluación de los CDA de la materia prima en *O. mykiss* y *Salmo salar*

		Materia Seca		Proteína bruta		Extracto Etéreo		Extracto No Nitrogenado		Energía bruta		Nitrógeno		Fósforo	
Media CDA		81,64	86,06	84,16	92,92	103,64	105,90	75,59	91,61	89,79	93,77	87,47	91,50	41,13	83,68
		{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}	{1}	{2}
Truca arco iris	{1}		a		a		a		a		a		a		a
Salmón Atlántico	{2}	b		b		a		b		b		b		b	

Tabla 10. Comparación de medias mediante el test de Tukey. Consideran el tratamiento aplicado al lupino como efecto principal en la evaluación de los CDA de la materia prima en *O. mykiss* y *Salmo salar*

CDA total			CDA proteínas			CDA extracto etéreo		
Especie e ingrediente	Media	Grupos homogéneos	Especie e ingrediente	Media	Grupos homogéneos	Especie e ingrediente	Media	Grupos homogéneos
TA-LCC	64,67	a	TA-LCC	31,03	a	SA-LC45	69,39	a
SA-LCC	70,92	ab	SA-LCC	40,74	b	TA-LC45	69,45	a
TA-LC	74,43	abc	TA-LC15	89,16	c	TA-LC	78,56	ab
SA-LC	79,16	abcd	TA-LM30a	91,79	cd	SA-LM30b	85,16	bc
TA-LC45	80,70	abcde	SA-LM30a	92,99	cd	TA-LM30a	93,23	cd
SA-LM30a	82,38	bcdef	TA-LM30b	96,04	cde	TA-LM30b	98,04	de
TA-LC15	82,45	bcdef	SA-LC15	97,12	cde	SA-LC	100,94	de
TA-LM30a	89,97	cdef	TA-LC45	97,64	cde	SA-LC15	100,99	de
SA-LM30b	90,36	cdef	TA-LC	99,28	de	SA-LM30a	101,32	de
SA-LC15	94,77	def	SA-LM30b	101,74	e	TA-LC15	107,66	e
TA-LM30b	97,60	ef	SA-LC45	112,43	f	SA-LCC	164,02	f
SA-LC45	98,74	f	SA-LC	112,48	f	TA-LCC	188,46	g
CDA extracto no nitrogenado			**CDA energía**			**CDA fósforo**		
Especie e ingrediente	Media	Grupos homogéneos	Especie e ingrediente	Media	Grupos homogéneos	Especie e ingrediente	Media	Grupos homogéneos
TA-LC	52,63	a	TA-LCC	70,17	a	SA-LC	12,95	a
SA-LC	54,86	ab	SA-LCC	78,23	ab	TA-LCC	19,23	ab
TA-LC45	68,52	abc	TA-LC	84,77	bc	TA-LC	20,63	ab
TA-LC15	71,74	abc	TA-LC45	89,60	bcd	TA-LM30a	25,48	ab
TA-LCC	82,21	bcd	SA-LC	91,66	bcd	SA-LM30a	31,36	ab
SA-LM30a	87,22	cde	SA-LM30a	92,74	cd	TA-LC45	33,63	b
TA-LM30a	87,72	cde	TA-LC15	94,12	cd	TA-LC15	56,12	c
TA-LM30b	90,76	cde	SA-LM30b	96,72	cd	SA-LM30b	83,08	d
SA-LCC	95,08	cde	TA-LM30a	99,14	d	TA-LM30b	91,70	d
SA-LM30b	95,91	cde	SA-LC15	100,52	d	SA-LC45	101,85	de
SA-LC15	105,31	de	TA-CM30b	100,93	d	SA-LCC	119,05	e
SA-LC45	111,26	e	SA-LC45	102,78	d	SA-LC15	153,79	e

TA= trucha arco iris y SA= salmón del Atlántico

La Tabla 10 muestra y compara en forma conjunta, a través del test de Tukey, la digestibilidad aparente de la materia prima en *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo salar*, para las harinas de lupino cruda con y sin cáscara y sometida a los diferentes tratamientos térmicos.

En tanto, la Figura 2 se muestra la respuesta individual de los coeficientes de digestibilidad aparente total, de proteínas, de extracto etéreo, de extracto no nitrogenado, de energía y del fósforo en trucha arco iris y el salmón del Atlántico para la harina de lupino sometido a los distintos tratamientos térmicos. Para aquellos valores de digestibilidad que superaron el 100%, por razones obvias se gráfico este valor como máximo (Figura 1 y Figura 2).

El CDA total del lupino crudo con y sin cáscara no se diferencia estadísticamente entre la trucha arco iris y el salmón del Atlántico, se alcanzaron valores de 70,1 y 64,7%, para el lupino crudo con cáscara y 74,4 y 79,1%, para el lupino crudo sin cáscara, respectivamente. El tratamiento térmico con calor húmedo (LC15 y LC45) y con calor seco (LM30a y LM30b) tuvo un efecto significativamente positivo en la digestibilidad aparente total tanto en trucha arco iris como en salmón del Atlántico y en ambas especies los valores fueron significativamente mas altos que los obtenidos con el lupino sin tratamiento térmico (crudo con y sin cáscara). La digestibilidad total más baja se obtuvo con el tratamiento micronizado en alta potencia (LM30b) en salmón del Atlántico y la más alta con el tratamiento calor húmedo (LC45) en salmón del Atlántico (Tabla 10). La comparación individual del CDA entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), revelan que el CDA en salmón del Atlántico fue numéricamente mayor en todos los tratamientos, sin embargo diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$) solo se obtuvieron con los tratamientos LC15 y LC45 (Figura 2a).

En ambas especies, los valores de CDA de las proteínas en el lupino con cáscara fueron significativamente menores a los valores del lupino crudo y los sometidos a los diferentes tratamientos térmicos. En términos generales, el lupino crudo sin cáscara y sin tratamiento térmico (LC) no mostró diferencias significativas con los tratamientos autoclavado (LC15 y LC45) y micronizado (LM30b y LM30a). Sin embargo, las digestibilidades más altas se obtuvieron en *Salmo salar* con los tratamientos (LM30b, LC45 y LC) (Tabla 10). La comparación individual del CDA de proteínas entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), revela que el salmón del Atlántico presenta valores numéricamente superiores en todos los tratamientos, sin embargo diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$) sólo se obtuvieron con los tratamientos LC y LC45 (Figura 2b).

El CDA del extracto etéreo (EE) para el lupino autoclavado (LC45) fue similar entre el salmón del Atlántico (69,4%) y la trucha arco iris (69,5%) y ambos valores fueron estadísticamente similares con el valor de CDA del lupino crudo sin cáscara (LC) en trucha arco iris. Los CDA del EE del lupino micronizado en alta y baja potencia en trucha arco iris presentaron valores estadísticamente similares con el lupino crudo (LC), el lupino autoclavado (LC15) y el lupino micronizado en alta potencia (LM30a) en salmón del Atlántico; con valores que variaron entre 98 y 100%. Si se considera como la máxima digestibilidad un 100%, el CDA del EE en salmón del Atlántico en los tratamientos LC, LC15 LM30a y LCC serían estadísticamente similares a los valores del CDA del lupino autoclavado (LC15) y crudo con cáscara (LCC) en trucha arco iris (Tabla 10). La comparación individual del CDA del EE entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), revela que el salmón del Atlántico exhibe valores estadísticamente iguales ($P>0,05$) en todos los tratamientos, excepto en el lupino LC y LM30a donde el CDA del EE es estadísticamente superior en Salmo salar (Figura 2c).

El CDA del extracto no nitrogenado (carbohidratos) presentó los valores más bajos con el lupino crudo en trucha arco iris y salmón del Atlántico, 52,6 y 54,9%, respectivamente; estos valores no se diferenciaron estadísticamente (P<0,05), de los valores de CDA en trucha arco iris para el lupino autoclavado (LC15 y LC45) y el lupino crudo sin cáscara. Los mayores valores de CDA de carbohidratos en *Salmo salar* fueron alcanzados con el lupino micronizado (LM30a y LM30b), autoclavado (LC15 y LC45) y con lupino crudo con cáscara (LCC), mientras que, en trucha arco iris los valores más altos de CDA de carbohidratos sólo se obtuvieron con lupino micronizado en baja y alta potencia (LM30a y LM30b); todos los valores de este grupo no presentaron diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 10). La comparación individual del CDA de los carbohidratos entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2) para los distintos tratamientos aplicado al lupino, mostró que el salmón del Atlántico exhibe valores numéricamente mayores en todos ellos, sin embargo, los tratamientos estadísticamente significativos (P<0,05) son los con lupino autoclavado (LC15 y LC45) (Figura 2d).

El CDA de la energía presentó los valores más bajos con el lupino crudo con cáscara en ambas especies (70,1% en O. *mykiss* y 78,2% en *S. salar*), el último valor no se diferenció estadísticamente (P<0,05), de los valores de CDA para el lupino crudo (LC) en trucha arco iris y salmón del Atlántico, tampoco con el lupino autoclavado (LC45) en trucha arco iris. Los valores más altos de CDA de la energía se obtuvieron con *S. salar* para el lupino micronizado (LM30a y LM30b) y autoclavado (LC15 y LC45), mientras que, en trucha arco iris los valores más altos se obtuvieron con el lupino micronizado (LM30a y LM30b) y lupino autoclavado LC15, los valores de todo este grupo variaron entre 92,7 y 100% sin diferencias estadísticas entre ellos.

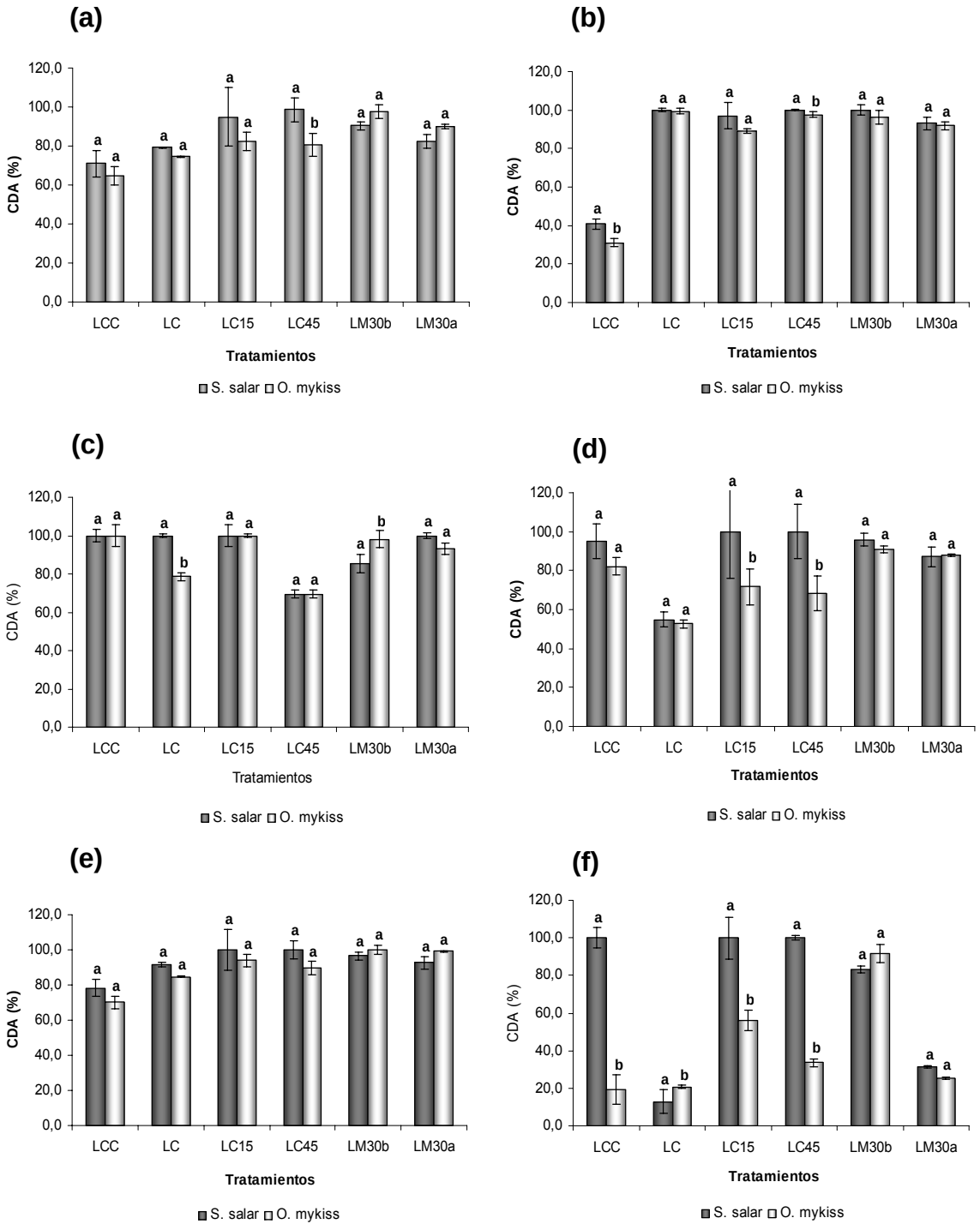


Figura 2. Digestibilidad aparente en *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* de la harina de lupino (*Lupinus albus)* sometida a diferentes tratamientos con calor, **(a)** CDA de total, **(b)** CDA de proteína, **(c)** CDA de extracto etéreo, **(d)** CDA de los hidratos de carbono, **(e)** CDA de la energía y **(f)** CDA del fósforo.

La comparación individual del CDA de la energía entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2) para los distintos tratamientos aplicado al lupino, mostró que el salmón del Atlántico exhibe valores numéricamente mayores en casi todos ellos, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 2e).

Los valores más bajos para el CDA del fósforo se obtuvieron con el lupino crudo sin cáscara en ambas especies, con el lupino con cáscara en trucha arco iris y con el lupino LM30a en ambas especies, sin diferencias estadísticas entre ellos. Mientras que los valores más altos se obtuvieron en salmón del Atlántico con el lupino LC45, LC15 y curiosamente con el lupino LCC todos con valores sobre 100. Por otro lado, el lupino LM30b en trucha y salmón y el lupino LC45 en salmón no se diferenciaron estadísticamente entre ellos. La comparación individual del CDA del fósforo entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), mostró valores mayores y estadísticamente diferentes en el salmón del Atlántico para el lupino LCC, LC, LC15 y LC45, mientras que el lupino LM30b y LM30a presentaron valores de CDA del fósforo iguales entre las especies. (Figura 2f).

3.4 DISCUSIÓN

La calidad nutricional del lupino evaluada en su composición proximal no tuvo cambios sustantivos por efecto de los diferentes tratamientos térmicos aplicados (Tabla 1). El calor húmedo y la micronización aplicada a la harina provocaron resultados diferentes en la digestibilidad aparente de las dietas por parte de la trucha y el salmón (Tabla 3, Figura 1), esto indirectamente explica que los tratamientos indujeron cambios en la materia prima que no son evidenciados por los análisis proximales. Sin embargo, ha sido ampliamente descrito que los vegetales en general y el lupino en particular poseen

numerosas sustancias que actúan como antinutrientes (Mundheim *et al*., 2004; Glencross *et al*., 2003b; Francis *et al*., 2001) y por consiguiente afectan los valores de digestibilidad aparente. De acuerdo a Glencross (2001), algunos factores antinutricionales presentes en el lupino incluidos los oligosacáridos, fitatos, saponinas, taninos e inhibidores de proteasas tienen un significativo efecto en la digestibilidad de las proteínas. De acuerdo a Pereira y Oliva-Teles (2004), la aplicación de diferentes tratamientos tecnológicos tales como el descascarado, procesamiento con calor o la humedad, pueden inactivar y remover o disminuir la mayoría de los factores antinutricionales presentes en fuentes de vegetales proteicos. Por lo tanto los tratamientos térmicos actuaron favorablemente en el mejoramiento de la digestibilidad de la harina del lupino crudo con y sin cáscara tanto en la trucha arco iris como en el salmón del Atlántico.

En los resultados del presente estudio es posible observar valores de CDA sobre 100% (Tabla 10) lo que racionalmente no puede ser, no obstante, este efecto ya ha sido explicado por otros autores (Hardy, 1997, Glencross *et al* 2005), lo que se explica por la concentración porcentual del nutriente en la materia prima que se evalúa y la concentración del mismo nutriente en la dieta de referencia. Según Glencross *et al* (2004a), estos caprichos ponen también de relieve la compleja naturaleza de la estimación de la digestibilidad aparente de un ingrediente cuando se incluye dentro de una dieta compuesta.

3.4.1 Digestibilidad de las dietas

Aún cuando el presente experimento fue para evaluar la digestibilidad de *Lupinus albus* como ingrediente en trucha arco iris y en salmón del Atlántico, la metodología envuelve inicialmente calcular la digestibilidad de una dieta compuesta por el 70% de una dieta estándar y 30% del ingrediente a evaluar

(Bureau *et al*., 1999). La evaluación de estas dietas en ambas especies (Tabla 3), donde se incorporó el 30% de *L. albus* sometido a los diferentes tratamientos térmicos, aporta algunos antecedentes interesantes de considerar. En términos generales la trucha arco iris respondió con valores de CDA más altos que el salmón del Atlántico en las 6 dietas, en promedio la digestibilidad aparente incremento un 8,3% para la materia seca, 3,7% para las proteínas, 1,4% para los lípidos, 15,8% para los carbohidratos, 5,9% para la energía y 12,1% para el fósforo. Estos valores son coincidentes con los de Refstie *et al*. (2000) quienes trabajando con dos dietas, una con sólo harina de pescado LT como fuente de proteína y otra con 32% de harina de pescado LT y 30% de harina de soya, encontraron que el CDA fue 6% más alto para el nitrógeno, 8% más alto para las grasas y 11% más alto para la energía en trucha que en salmón. En salmón y trucha arco iris los mayores sitios de absorción de aminoácidos, azucares y lípidos son los ciegos pilóricos, según Refstie *et al*. (2000), el mayor numero de ciegos y/o la mayor superficie de absorción intestinal en trucha que en salmón pueden ser la explicación de la más alta digestibilidad de las dietas en truchas que en salmón del Atlántico.

Sorprendentemente, cuando se compara la digestibilidad del ingrediente con la harina de lupino con y sin cáscara y sometida a los diferentes tratamientos térmicos (Tabla 7 y Figura 2), se constató que hay una significativa diferencia entre la trucha arco iris y el salmón del Atlántico en cuanto a los CDA para el lupino sometido a los distintos tratamientos (Tabla 8). En términos generales, los resultados del presente estudio son consistentes con los resultados de Refstie *et al*. (2000) quienes también notaron diferencias en la respuesta nutricional del salmón del Atlántico y la trucha arco iris cuando eran alimentadas con soya. Glencross *et al*. (2004a), compararon la digestibilidad de una serie de lupinos y productos proteicos de soya en salmón y trucha; ellos también observaron varias diferencias entre las dos especies en su

capacidad para digerir los nutrientes y la energía cada uno de los productos testados. Por su parte Krogdahl *et al*. (2004) también encontraron diferencias en la digestibilidad y retención de macronutrientes en trucha arco iris y salmón del atlántico cuando evaluaron dietas con altos y bajos niveles de almidón en agua dulce y salada. Anteriores estudios de Refstie *et al*. (1998) con salmón del Atlántico y de Kaushik *et al*. (1995) con trucha arco iris, quienes evaluaron la digestibilidad de alimentos similares, también encontraron marcadas diferencias entre ambas especies. Estas diferenciaciones son inicialmente notadas en las diferentes capacidades que cada especie tiene para digerir la energía de los ingredientes con altos niveles de proteínas; sin embargo productos con bajos niveles de proteínas (<600 g/kg DM) tienen energías digestibles similares en ambas especies (Glencross *et al*., 2004a). Los resultados del presente estudio son coincidente con los Glencross *et al* (2004a) en que la capacidad digestiva del salmón del Atlántico aparece con una mayor respuesta en CDA para todos los nutrientes y la energía del lupino sometido a los diferentes tratamientos (Tabla 9). Curiosamente cuando tales materias primas son incluidas en dietas convencionales, la respuesta digestiva se invierte y la trucha arco iris aparece con valores de CDA más altos que el salmón del Atlántico (Tabla 3, Figura 1). De acuerdo a los estudio de Refstie *et al*. (2000), la digestibilidad de los nutrientes fue más alta en trucha arco iris que en salmón del atlántico, mientras que la utilización de los nutrientes absorbidos para crecimiento fueron más eficientes en salmón que trucha. Además, la trucha arco iris parece menos sensitiva que el salmón del atlántico a los componentes de la harina de soya que alteran la digestión y/o la absorción de nutrientes y consecuentemente el crecimiento. Krogdahl *et al*. (2004) encontraron que la trucha arco iris mostró una más alta digestibilidad que el salmón del Atlántico y mucho más pronunciada con dietas con altos niveles de hidrato de carbono; además la digestibilidad fue afectada

negativamente con el nivel de almidón en salmón del Atlántico, pero fue menos severa en la trucha arco iris.

3.4.2 Digestibilidad de los ingredientes

El CDA total o de la materia seca del lupino crudo con y sin cáscara no presentó diferencias entre las especies, aún cuando el CDA del lupino crudo sin cáscara fue numéricamente más alto que el lupino crudo con cáscara en ambas especies (Tabla 10). En contraposición Glencross *et al.* (2005), encontraron que el nivel de procesamiento de las variedades de lupino y soya tienen una significativa mejora en la mayoría de los parámetros de la digestibilidad, ellos encontraron que los mayores incrementos relativos de la digestibilidad de la materia orgánica, energía y proteína fueron observados entre las harinas sin cáscaras y los concentrados de proteínas. Los resultados del presente estudio concuerdan con los de Lee *et al*. (2002a) en juveniles de *Sebastes schlegeli "(Rockfish)"* quienes encontraron que la digestibilidad de la materia seca decrecía cuando el extracto libre de nitrógeno aumentaba variando desde 73 a 95% para productos animales y harina de gluten de maíz y de 32 a 54% para harina de soya, algodón, trigo y levadura de cerveza. Encontrando además que la digestibilidad aparente de la energía de los ingredientes seguía similar tendencia para diferencias en la digestibilidad de la materia seca.

Varios autores han reportado que los peces carnívoros tienden a utilizar la materia seca y la energía mejor en productos animales que en vegetales, la digestibilidad de la materia seca y de la energía parece estar muy relacionada con la cantidad y composición química de los carbohidratos que ellos contienen. Se ha descrito que los carbohidratos indigestibles (fibra y oligosacáridos) pueden perturbar los procesos digestivos en salmónidos

(Storebakken *et al*., 2000 y Glencross *et al*. 2003b, 2005). En este sentido el lupino no es la excepción, aún cuando a diferencia de otras leguminosas no posee almidón, tiene altos niveles de polisacáridos solubles e insolubles que forman principalmente la estructura de la semilla, además los azucares libres contenidos en la harina de semilla entera están dominados por glucosa y galactosa cada uno en alrededor de 30 a 40 g/kg de materia seca (Glencross, 2004).

De acuerdo a Allan y Booth (2004), el lupino descascarado mejora la digestibilidad de todos los nutrientes, pero la extrusión no tiene efecto significativo en la harina de lupino porque no contiene almidón o antinutrientes termolábiles. Sin embargo en el presente estudio la digestibilidad de la materia seca fue significativamente mejorada con el tratamiento con calor húmedo (LC15 y LC45) y calor seco (LM30a y LM30b) tanto en trucha arco iris como en salmón del Atlántico y en ambas especies los valores fueron significativamente mas altos que los obtenidos con el lupino sin tratamiento térmico (crudo con y sin cáscara). Como efectivamente el lupino no posee almidón en su fracción libre de nitrógeno (Van Barneveld, 1999; Glencross, 2004), se podría sugerir que muchos de estos polisacáridos solubles, principalmente los hidrosolubles y otros antinutrientes, pudieron ser arrastrados por el vapor de agua en el tratamiento con calor húmedo, de hecho el CDA de la materia seca más alto se obtuvo con el tratamiento calor húmedo (LC45) en salmón del Atlántico (Tabla 10). La comparación individual del CDA de la materia seca entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), revelan que el CDA en salmón del Atlántico fue numéricamente mayor en todos los tratamientos, sin embargo diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$) solo se obtuvieron con los tratamientos LC15 y LC45 (Figura 2a).

En ambas especies, los valores de CDA de las proteínas en el lupino con cáscara fueron significativamente menores a los valores del lupino crudo y a los sometidos a los diferentes tratamientos térmicos. Estos resultados son concordantes con los de Allan y Booth (2004) en perca plateada (*Bidyanus bidyanus)* y los de Thiessen *et al*. (2003) en juveniles de trucha arco iris, donde el descascarado de lupino y arvejas mejoraban considerablemente la digestibilidad de la proteína. También Glencross *et al*. (2005) en trucha arco iris encontraron que los mayores incrementos relativos de la digestibilidad de la proteína fueron observados entre las harinas sin cáscaras y los concentrados de proteínas. En el presente estudio, el lupino crudo sin cáscara y sin tratamiento térmico (LC) no mostró diferencias significativas con los tratamientos autoclavado (LC15 y LC45) y micronizado (LM30b y LM30a). De acuerdo a Sørensen *et al*. (2002), el calor moderado aplicado a alimentos o ingredientes ricos en proteínas puede ser beneficioso para el valor nutricional de las proteínas, el calor puede (por desnaturalización) hacer perder la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de las proteína, mientras la estructura primaria permanece intacta, estos cambios estructurales no afectan la composición de aminoácidos de la proteína pero si facilitan la utilización digestiva de las mismas. Sin embargo, este no parece ser el caso de la proteína en el lupino descascarado sometido a los distintos tratamientos térmicos en el presente estudio, las digestibilidades más altas se obtuvieron en *Salmo salar* con los tratamientos (LM30b, LC45 y LC) (Tabla 10). Por otra parte la comparación individual del CDA de proteínas entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), revela que el salmón del Atlántico presenta valores numéricamente superiores en todos los tratamientos, sin embargo diferencias estadísticas significativas entre las especies ($P<0,05$) sólo se obtuvieron con los tratamientos LC y LC45 (Figura 2b).

Glencross *et al*. (2004a) encontraron que la digestibilidad de las proteínas de lupino son generalmente uniformes entre ambas especies, sólo la harina de semilla entera tiene una digestibilidad significativamente más alta en salmón del Atlántico que en trucha arco iris y el concentrado proteico de soya una digestibilidad más baja. Glencross *et al.* (2003b) y van Barneveld, R.J., (1999), han descrito que el lupino posee un importante grupo de oligosacáridos, principalmente alfa galactósidos homólogos de la sucrosa, su nivel en lupino varía entre 70 a 120 g/Kg de MS, estos compuestos interfieren con la digestión de otros nutrientes, alterando el equilibrio osmótico y provocando fermentación aeróbica de los azúcares e incrementando la producción de gas. Los estudios de Glencross *et al*. (2003b) han demostrado que los oligosacáridos contenidos el *L. angustifolius* tienen una negativa influencia en el valor nutricional de su proteína cuando se alimenta trucha arco iris, sin embargo el procesamiento de la harina de lupino mediante una extracción alcohólica de los oligosacáridos mejoró su valor nutricional. Según los resultados del presente estudio pareciera que el nivel de oligosacáridos en la harina de *Lupinus albus* sin cáscara con o sin tratamiento térmico no influenció la digestibilidad de las proteínas. Es más, podemos observar en la tabla 10 valores cercanos a 100 y sobre 100 para lupino crudo sin cáscara en trucha arco iris y salmón del Atlántico, aunque el tratamiento térmico por calor húmedo fue significativamente mejor que el tratamiento por micronización.

El análisis del CDA del extracto etéreo (EE) del lupino sometido a diferentes tratamientos no tiene explicaciones muy lógicas, de hecho varios autores (Glencross, *et al*. 2005 y 2004a, Bureau y Cho, 1999; Bureau *et al.* 1999) no evalúan este parámetros debido a que como los niveles del EE en la materia prima son relativamente bajos se ven fuertemente influenciados por el nivel del nutriente en la dieta de referencia, lo que da valores poco confiables, de hecho en el presente estudio, los valores del CDA del EE del lupino crudo con cáscara fueron los más altos tanto en trucha como salmón del Atlántico (Tabla

10). Varios autores (Storebakken *et al*., 2000a; Refstie *et al*., 2000; Glencross *et al*., 2003b, 2005) han mostrado que el nivel de carbohidratos soluble e insolubles no sólo afectan la digestibilidad de proteínas sino que también la de los lípidos. De acuerdo a Thodesen y Storebakken (1998), la digestión y absorción de grasas y lípidos solubles son normalmente afectados por los polisacáridos no almidón (PNA), esto ha sido mostrado en varios estudios con monogástricos de sangre caliente. En el presente estudio, la comparación individual del CDA del EE entre trucha arco iris y salmón del Atlántico, revela que el salmón del Atlántico exhibe valores estadísticamente iguales ($P>0,05$) en todos los tratamientos, excepto en el lupino LC y LM30a donde el CDA del EE es estadísticamente superior en *Salmo salar* (Figura 2c). Estos resultados resultan poco claros y requieren más investigación.

El CDA del extracto no nitrogenado (carbohidratos) presentó los valores más bajos con el lupino crudo (LC) en trucha arco iris y salmón del Atlántico, 52,6 y 54,9%, respectivamente; estos valores no se diferenciaron estadísticamente ($P<0,05$), de los valores de CDA en trucha arco iris para el lupino autoclavado (LC15 y LC45) y con el valor del lupino crudo sin cáscara. Estos resultados evidencian que el tratamiento con calor húmedo no provocó cambios en el lupino, contrariamente a los resultados de Erfanullah and Jafri (1998) en carpa común encontraron que el calor de cocción por vapor del maíz amarillo y la patata mejoró considerablemente los CDA de los carbohidratos. De alguna manera los resultados del presente estudio son concordantes con los de Allan y Booth (2004) en perca plateada, quienes encontraron que la extrusión mejoró significativamente la digestibilidad en arvejas, menos acción tuvo en harina de soya, no tuvo ningún beneficio en lupino y fue perjudicial en harina de canola. Como se describió anteriormente el lupino no posee almidón, este último compuesto puede ser convenientemente modificado a través del calor húmedo o seco, entregando un almidón gelatinizado o dextrinado, respectivamente, estos almidones tienen una más alta digestibilidad que los

almidones nativos en monogástricos. Por otra parte los mayores valores de CDA de carbohidratos en *Salmo salar* fueron alcanzado con el lupino micronizado (LM30a y LM30b), autoclavado (LC15 y LC45) y curiosamente con lupino crudo con cáscara (LCC). Se acuerdo a Thodesen y Storebakken, (1998), los polisacáridos no almidón (PNA) pueden ser solubles en soluciones alcohólicas suaves o en agua, ellos tienen varios componente que afectan la viscosidad en el intestino y alteran la absorción de los nutrientes. Como se dijo anteriormente el lupino posee una importante concentración de NPA, es probable que el vapor aplicado en el tratamiento con calor húmedo y la micronización haya beneficiado la eliminación de esto PNA, haciendo que la digestibilidad del NFE en salmón del Atlántico haya mejorado. La comparación individual del CDA de los carbohidratos entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2) para los distintos tratamientos aplicado al lupino, mostró que el salmón del Atlántico exhibe valores numéricamente mayores en todos ellos, sin embargo, los tratamientos estadísticamente significativos ($P<0,05$) son los con lupino autoclavado (LC15 y LC45) (Figura 2d). Aún cuando ambas especies responden en forma más o menos similar para ingredientes con altos niveles de PNA, el salmón del Atlántico tiene una mejor capacidad para una completa digestión de la energía de los ingredientes ricos en proteína (Glencross *et al*., 2004a).

El CDA de la energía en ambas especies presentó los valores más bajos con la harina de lupino con cáscara (70,1% en O. *mykiss* y 78,2% en *S. salar*) y sin cáscara (84,7% en O. *mykiss*), ambas sin tratamiento térmico. Es evidente que la digestibilidad de los carbohidratos en peces es afectada por el tipo de carbohidratos y el propio sistema digestivo del pez. Las especies carnívoras, no están enzimáticamente equipadas para digerir carbohidratos complejos, como consecuencia la digestibilidad decrece con el incremento de la complejidad estructural del carbohidrato. Allan *et al*. (2000), demostró que la

reducción o remoción de los componentes hidrocarbonados de ingredientes vegetales permiten incrementar la digestibilidad de la materia seca y la energía en perca plateada (*Bidyanus bidyanus*). Del mismo modo Booth *et al*. (2001) evaluaron la digestibilidad de harina de *L. angustifolius* con y sin cáscara, también en perca plateada, encontrando un mejoramiento en la digestibilidad de la materia seca y de la energía para la harina descascarada. En cuanto a carbohidratos, los lupinos se caracterizan por poseer una escasa cantidad de almidón, altos niveles de polisacáridos insolubles (celulosa, hemicelulosa y lignina en la cáscara) y solubles (ej. β (1-4) galactano en los cotiledones) PNA y altos niveles de oligosacáridos rafinosa, todos los cuales pueden afectar la utilización de la energía y la digestión de otros nutrientes en la dieta (van Barneveld, 1999). De acuerdo a Glencross, *et al*. (2003b) la fuerte correlación entre el contenido de la proteína de la harina sin cáscara y la digestibilidad de su nitrógeno tiene un efecto directo en la energía digestible. Notablemente, el contenido de la proteína de la harina sin cáscara tiene más influencia sobre la digestibilidad de su energía que la digestibilidad del nitrógeno. Esto está probablemente relacionado con la gran contribución relativa que hace la proteína para el contenido de energía dietaria en relación al contenido de los carbohidratos en la harina de lupino. Por otro parte, los resultados de este estudio son parcialmente concordantes con lo reportado por Storebakken *et al*. (1998) en cuanto que el incremento dietario de carbohidratos de 10 a 20% reduce el CDA de la material seca, energía y grasas pero tiene un pequeño efecto sobre la digestibilidad de la proteína en trucha arco iris. Esto último no es coincidente con los resultados del presente estudio dado que el lupino con cáscara tiene un fuerte efecto en la digestibilidad de las proteínas (Tabla 10), pues en este caso se trata de los PNA insolubles presentes en la cáscara y no de dextrinas o almidón como en el caso de los resultados de Storebakken *et al*. (1998).

En cuanto al efecto en la digestibilidad de la energía de la harina de lupino sometida a los tratamientos con calor, los valores más altos se obtuvieron con *S. salar* para el lupino micronizado (LM30a y LM30b) y autoclavado (LC15 y LC45), mientras que, en trucha arco iris con el lupino micronizado (LM30a y LM30b) y lupino autoclavado LC15, variando todo el grupo entre 92,7 y 100% sin diferencias estadísticas entre ellos. Cabe hacer notar que estos valores no se diferenciaron estadísticamente del CDA de la energía del lupino sin cáscara sin tratamiento térmico en S. salar (91,7%). Allan & Booth (2004), evaluaron la digestibilidad de arvejas, lupino, canola y soya en perca plateada y encontraron marcadas diferencias en el efecto de la extrusión sobre arvejas y lupino. La digestibilidad de ambas especies fue mejorada por el descascarado; el CDA de la materia seca y la energía incremento entre 8 y 13% para ambos ingredientes, sin embargo, el calor aplicado a través de la extrusión mejoró la digestibilidad de la materia seca, energía y proteína solo en arvejas, mientras que con *L. angustifolius* sometida a extrusión encontraron que el CDA de la materia seca se redujo un 6% y los CDAs de la energía y proteínas se mantuvieron constantes en comparación con el lupino crudo sin extrudir. Coincidentemente, en el presente estudio se puede observar que el calor aplicado al lupino no tuvo un efecto estadísticamente significativo en el CDA de la energía, lo que puede ser explicado por la escasa cantidad de almidón que posee el lupino, siendo sus carbohidratos predominantes son PNA solubles e insolubles, y el calor seco o húmedo aplicado a través de los procesos de extrusión, micronización o autoclavado tienen un efecto significativo en el desdoblamiento de la molécula de almidón. Higuera *et al*. (1988) especularon que la aplicación de calor al lupino puede provocar un incremento de la digestibilidad de galactanos e inducir a una acumulación en el hígado, provocando una hipoglicemia y consecuentemente un deterioro de la salud del pez. Sin embargo Allan & Booth (2004) estiman que en es improbables que aumenten la digestibilidad de los galactanos dado que la

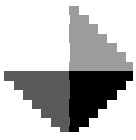
digestibilidad de materia seca y la energía en el caso de lupino disminuye o se mantiene constante después de la extrusión. Sin embargo, en el presente estudio para el caso de ambas especies el calor muestra un efecto numéricamente mayor en el CDA de la energía (estadísticamente no significativo) que es coincidente con el incremento en el CDA de la materia seca y el ENN, lo cual podría estar evidenciando que el calor estaría provocando algún cambio estructural en la naturaleza de los carbohidratos del lupino, no obstante es difícil aventurar si esta tendencia en el aumento de la digestibilidad por efecto del calor sea positiva o negativa para la salud de los peces en el largo plazo.

La comparación individual del CDA de la energía entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2) para los distintos tratamientos aplicado al lupino, mostró que el salmón del Atlántico exhibe valores numéricamente mayores en casi todos ellos, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 2e). Glencross *et al*. (2004a), compararon la digestibilidad de lupino y soya con diferentes niveles de procesamiento en trucha arco iris y salmón del Atlántico; en términos generales, ellos observaron que la digestibilidad de la energía fue significativamente mejorada en ambos ingredientes cuando estos incrementaban el nivel de proteínas. Encontrando también que la digestibilidad específica de la energía para harina de lupino, harina de soya y concentrado proteico de soya fueron similares para trucha arco iris, sin embargo, fueron notadas diferencias significativas entre las dos especies en su habilidad para digerir la energía contenida en los ingredientes; coincidente con los resultados del presente estudio, los valores de digestibilidad de la energía para el rango de productos examinados por Glencross *et al*. (2004a) fueron generalmente más altos en salmón del Atlántico que en trucha arco iris y en relación directa con el incremento de la proteína del ingrediente. De

acuerdo al propio autor, podría ser discutido que los PNA limitan la digestión de la energía en salmón del Atlántico más que en trucha arco iris, visto por la mayor respuesta en la digestibilidad de la energía en ausencia de PNA. En otras palabras se podría sugerir que trucha arco iris son especies más sensitivas en la evaluación de calidad de ingredientes por digestibilidad basado en la observación que ellas no responden tan bien a la reducción en PNA con incremento en proteína como lo hace el salmón del Atlántico.

Los resultados obtenidos en la digestibilidad del fósforo resultan un tanto erráticos y difíciles de explicar alguna tendencia en cuanto al efecto propio de la especie o de los tratamientos de calor aplicado al lupino. Glencross *et al.* (2004a) encontraron una clara diferencia en la capacidad de las dos especies para digerir el fósforo de diferentes ingredientes proteicos vegetales, ellos encontraron que para la mayoría de los ingredientes evaluados la digestibilidad del fósforo por la trucha fue considerablemente mayor que la observada en salmón del atlántico, aunque no tienen explicación para estas diferencias. Contrario con esos resultados, en el presente estudio la comparación individual del CDA del fósforo entre trucha arco iris y salmón del Atlántico (Figura 2), mostró valores estadísticamente mayores en el salmón del Atlántico para el lupino LCC, LC, LC15 y LC45, mientras que el lupino LM30b y LM30a presentaron valores de CDA del fósforo iguales entre las especies. Por otro lado, varios resultados de digestibilidad de fósforo del presente estudio son estimados con valores superiores a 100%. Para Glencross *et al*. (2004a y 2005), quienes en ambos trabajos estimaron también valores de digestibilidad para el fósforo superiores a 100% en lupino sometido a diferentes tratamientos, explican que este efecto es debido al bajo contenido de fósforo del ingrediente testado, esforzando al pez adicionalmente a derivar fósforo desde los componentes de la dieta de referencia en la dieta test. El resultado de este incremento de digestión del fósforo desde cada uno

de los componentes de dieta test hace que el efecto del cálculo sobre la digestibilidad de los productos sea más grande que 100%. Hua y Bureau (2006), advierten que la digestibilidad del fósforo probablemente no es una simple función del nivel de fósforo dietario, las características químicas de los diferentes tipos de compuestos fosfatados pueden resultar en diferencias en la dinámica que envuelve la digestión y absorción del fósforo en el tracto digestivo, lo cual puede afectar enormemente la digestibilidad dietética del fósforo. Para el presente estudio los valores en si mismo aparecen contradictorios, por ejemplo el CDA del fósforo para el LCC (lupino crudo con cáscara) en trucha arrojó un valor de 19,23% mientras que el mismo ingrediente en salmón del Atlántico sobrepaso el 119%, la variación de estos resultados parece mejor explicada por las concentraciones del nutriente en las propias materias primas, cuando estas son muy pequeñas, como en el caso del fósforo del orden del 4,9 g/Kg promedio (independiente del tratamiento aplicado) en la materia prima, cualquier variación, incluso del orden de las décimas en la concentración de las heces pueden generar valores superiores a 100% y en algunos casos valores negativos. En el presente estudio cuando se evaluó el LCC la concentración promedio de fósforo en las heces de la trucha arco iris fue 1,48% mientras que el salmón del Atlántico fue en promedio 1,24%, en este caso una diferencia de una décima equivale a 4,16 puntos porcentuales lo que genera resultados de CDA del fósforo tan disímiles como los mostrados anteriormente. Por tal motivo pareciera no recomendable utilizar este método de valoración de la digestibilidad cuando las concentraciones de nutrientes en las materias primas son muy bajas.



CAPÍTULO IV:
Experimento 2

INCORPORACIÓN DIETARIA DE GRANO ENTERO DE LUPINO BLANCO (*Lupinus albus*) EN DIETAS EXTRUIDAS PARA TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*): EFECTOS SOBRE LOS ÍNDICES PRODUCTIVOS, LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN EL MÚSCULO.

4.1 INTRODUCCIÓN

En Chile al igual que en otros países productores de peces carnívoros a través de la acuicultura, los costos por concepto de alimento representan entre el 40 y 60% de los costos operacionales del cultivo (Hardy, 2006). Como es sabido, la harina de pescado ha sido la principal materia prima de origen proteico para la fabricación de los alimentos comerciales de salmónidos y otros peces carnívoros (Hardy, 1988; Hasan, 2001). En la actualidad, este insumo finito es bastante escaso y la alta demanda ha elevado sus precios considerablemente (IFFO, 2006). Por otro lado, su disponibilidad mundial a alcanzado niveles de producción estáticos (SOFIA, 2006), lo cual se ve agravado cíclicamente por el fenómeno del Niño (Cubillos *et al*., 2002).

La eventual escasez a mediano plazo de la harina de pescado, genera nuevos desafíos a las empresas del rubro y a las instituciones científicas y tecnológicas chilenas, que ya ha comenzado a trabajar en la búsqueda de materias primas alternativas a la harina de pescado (Visión acuícola 2006, 2007).

Las materias primas de origen vegetal se constituyen como una de las principales fuentes de proteína alternativa en las dietas para peces. La competitividad de las harinas vegetales, frente a las harinas de pescado, se debe a su mayor producción, la cual no se encuentra limitada por la productividad natural del medio. Además, muchas de ellas son

subproductos agroindustriales y por consiguiente, los precios pueden llegar a ser muy competitivos (Tacon, 1994; De la Higuera, 1998; Hardy, 2006).

Entre las harinas de origen vegetal, las leguminosas de grano, han sido intensamente probadas a nivel mundial como reemplazo de la harina de pescado en dietas para peces (Allan, 1997; Glencross, 2002; Lee *et al*., 2002; Glencross *et al*. 2004, 2007).

En Chile, un ingrediente potencial para ser usado en reemplazo de la harina de pescado es la harina de lupino. El cultivo del lupino ocupa un lugar secundario en la agricultura en chilena, a pesar de que las condiciones que ostenta la región sur del país son favorables para el desarrollo de su cultivo, este no se ha masificado. Chile produce lupino amargo y dulce (bajos niveles de alcaloides), el primero es exportado a Europa para la producción de "snack", mientras que le segundo es usado principalmente en alimentación animal, principalmente por la industria avícola y bovina. Por otro lado, más allá de las industrias que hoy consumen la mayor parte del lupino, existe un gran potencial en la industria de alimentos para salmónidos, y fácilmente podría competir con la soya y sus derivados, además facilitaría su trazabilidad al ser una materia prima de origen local. Es así como durante el año 2007, del 1.100.000 toneladas producidas de alimento para salmónidos, se estima que un 0,7% podría corresponder a lupino dulce descascarado proveniente de la agricultura nacional.

El reemplazo de la harina de pescado por harina de lupino en dietas para las distintas especies de salmónidos ha sido reportado con resultados satisfactorios, en cuanto a crecimiento y digestibilidad, por diversos autores (De la Higuera, 1988; Moyano et al*.,* 1992; Burel *et al.,* 1998; Carter y Hauler, 2000; Carter y Farhangi, 2001; Bórquez y Alarcón, 2002).

No obstante, la posibilidad de utilizar las diferentes materias primas de origen vegetal debe responder a los requerimientos nutricionales de la especie y la inocuidad del producto final para consumo humano (Guillaume and Metailler, 1999), siendo el contenido de aminoácidos y ácidos grasos, factores determinantes al evaluar una potencial inclusión en el alimento. Así, por ejemplo, la utilización de bajas inclusiones de materias primas vegetales en la dieta, no manifiestan efectos inmediatos sobre los índices productivos y digestibilidad (Glencross *et al*., 2004a), sin embargo, pueden afectar fisiológicamente al pez al modificar la composición de ácidos grasos del alimento (Storebakken *et al*., 2000).

El presente estudio, evalúa el efecto sobre los parámetros productivos, la utilización digestiva, la composición de los ácidos grasos en el músculo y la histología al incluir grano de lupino entero en bajos niveles (10, 15 y 20%) en dietas extruidas para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Dietas

Fueron evaluadas 4 dietas extruidas, una dieta control (L0) y tres dietas con inclusión de 10, 15 y 20% de lupino entero (L10, L15 y L20), todas fabricadas en la planta de Biomar Chile (Rancagua) . Las formulaciones se realizaron mediante el software FORMAT, considerando requerimientos nutricionales como los niveles mínimos de aminoácidos, y restricciones de fabricación tal como mínimo porcentaje de almidón extruíble y mínimo porcentaje de humedad. La formulación y composición proximal de las dietas se muestra en la Tabla 1, mientras que la Tablas 2 y 3 muestran el perfil de ácidos grasos y aminoácidos de las mismas.

Tabla 1. Formulación y composición de las dietas experimentales

	Dietas experimentales			
	L0	L10	L15	L20
Ingredientes (%)				
Harina de pescado[a]	46,7	42,6	40,6	38,0
Aceite de pescado[a]	15,0	14,2	14,1	14,0
Semilla entera de lupino[b]	0.0	10,0	15,0	20,0
Harina de trigo[c]	22,6	16,2	13,3	13,3
Gluten de maiz[d]	8,0	8,0	8,0	8,0
Harina hidrolizada de pluma[e]	7,0	7,0	7,0	7,0
Premix Biomar	0,7	0,7	0,7	0,7
Composición Proximal Teórica (%)[f]				
Materia seca	90,9	90,9	91,1	93,0
Proteína bruta	45,0	45,0	45,0	45,0
Lípidos totales	20,0	20,0	20,0	20,0
Lisina	2,7	2,6	2,6	2,6
Metionina	1,0	1,0	1,0	0,9
Met + Cist	1,8	1,7	1,7	1,7
Energía bruta (Kj/Kg)	21,7	21,7	21,7	22,0
Composición Proximal Analítica (%)[f]				
Materia seca	90,7	92,7	92,0	90,5
Proteína bruta	45,1	47,0	46,4	45,4
Lípidos totales	23,3	23,2	21,8	23,5
Ceniza	7,7	8,1	7,6	7,4
Fibra bruta	1,1	1,4	2,4	3,5
Extracto libre de nitrógeno	22,9	20,3	21,7	20,2
Energía bruta (Kj/Kg)	23,8	23,8	23,3	23,5

[a]Aceite de pescado y Harina de pescado chilena, Super Prime, secada por vapor (Exapesca S.A., Talcahuano, Chile): 68% de proteína cruda y 12% lípido crudo. [b]Lupino blanco (*Lupinus albus*) var. Hamburg (Sel Chile S.A. Temuco, Chile): 37,3% proteína cruda, 7,4% lípido crudo y alcaloides totales 0,012%. [c]Graneles Chile S.A. Santiago, Chile: 10% proteína cruda, 1% fibra. [d]Subproducto de la industría de almidón y producción de aceite de maíz (Graneles Chile S.A. Santiago, Chile): 60% proteína cruda y 3% lípido crudo. [e]Subproducto de la industria de pollos (Terramar Chile S.A., Santiago, Chile): 82% proteína cruda y 6% de lípido crudo. [f]Los datos son expresados en base seca.

4.2.2. Estudio de Crecimiento

El bioensayo de crecimiento se llevó a cabo en la estación experimental piscicultura Los Laureles; perteneciente a la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco (Temuco, Chile). Se utilizaron juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), de un peso promedio inicial de 65,9 ± 15,11g. Durante los 10 días previos al experimento los peces fueron mantenidos en un estanque de 2m^3 para ser aclimatados a sus nuevas condiciones de cautiverio. En este periodo fueron alimentados con la dieta

control, la misma que fue utilizada posteriormente en el experimento**.** Antes de ser distribuidos en los estanques de crecimiento, los peces fueron sometidos a un ayuno de 48 h para ser pesados y medidos. La prueba de crecimiento tuvo una duración de 14 semanas.

Los peces se distribuyeron al azar (46 individuos por estanque) a una densidad promedio de 10,7kg/m^3, en 12 estanques circulares de fibra de vidrio de 300 litros, después de 8 semanas los peces fueron traspasados a 12 estanques también de fibra de vidrio de 500 Lts. (descritos en la metodología general de esta tesis).

El abastecimiento de agua a cada estanque se realizó por gravedad con una tasa de cambio de 1,5/hora. La temperatura promedio del agua durante todo el período de experimentación fue de 13,5 ± 2,8ºC y el oxígeno disuelto promedio de 9,7 ± 0,2 ml/l. Las condiciones de manejo, incluido el sistema de alimentación son descritas en la metodología general de esta tesis.

Antes de comenzar con el experimento de crecimiento se muestrearon al azar 15 peces para los análisis de ácidos grasos, composición corporal e histología. Al finalizar el experimento, se colectaron al azar 5 peces por replica, los cuales fueron eutanasiados con benzocaina (BZ-20, Laboratorios Veterquimica, Santiago, Chile). Se registró peso del pez completo y peso del hígado, luego muestras de carcasa (pez entero) y músculo dorsal se trituraron y homogenizaron separadamente, siendo congeladas para posterior análisis de composición proximal y perfil de ácidos grasos totales, respectivamente.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales (g/100g de ácidos grasos detectados).

	Experimental diets			
	Control	**L10**	**L15**	**L20**
% Total lipid	21,18 ± 0,88	21,52 ± 0,86	20,09 ± 0,57	21,27 ±0,39
Ácidos grasos				
14:0	8,04 ± 0.24	8,49 ± 2,16	6,78 ± 1,65	6,49 ± 0,26
15:0	0,90 ± 0.02	0,91 ± 0,17	0,72 ± 0.20	0,66 ± 0,01
16:0	20,80 ± 0,09	21,70 ± 2,70	19,24 ± 1,63	19,40 ± 0,04
17:0	0,97 ± 0,04	0,96 ± 0,01	1,06 ± 0.17	0,93 ± 0,03
18:0	4,21 ± 0,08	4,17 ± 0,16	4,20 ± 0,01	4,24 ± 0,07
21:0	2,58 ± 0,10	2,40 ± 0,21	2,42 ± 0,02	2,30 ± 0,01
23:0	0,73 ± 0,04	0,39 ± 0,55	0,70 ± 0,01	0,64 ± 0,01
Total SAFA	38,30 ± 0,17	39,36 ± 4,07	35,82 ± 3,46	35,09 ±0,28
16:1	6,47 ± 0,04	6,45 ± 0,64	5,61 ± 0,30	5,57 ± 0,05
17:1	1,04 ± 0,07	1,09 ± 0,14	1,00 ± 0.00	1,04 ± 0,00
18:1n9t	12,47 ± 0,05	12,85 ± 0,44	14,56 ± 0,36	15,33 ± 0,07
18:1n9c	2,77 ± 0,00	2.71 ± 0.08	2.80 ± 0.12	2.82 ± 0.03
20:1n9	1,46 ± 0,05	1,41 ± 0,22	1,49 ± 0,20	1,49 ± 0,01
24:1n9	0,48 ± 0,00	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,05
Total MUFA	24,85 ± 0,03	25,00 ± 0,06	26,16 ± 0,26	26,94 ± 0,11
18:2n6t	1,60 ± 0,02	1,65 ± 0,25	1,47 ± 0,08	1,46 ± 0,02
18:2n6c	5,90 ± 0,12	6,19 ± 0,35	6,39 ± 0,00	6,76 ± 0,07
18:3n3	1,27 ± 0,06	1,36 ± 0,01	1,58 ± 0,06	1,65 ± 0,01
18:3n6	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,44 ± 0,02	0,42 ± 0,03
20:3n6	0,50 ± 0,04	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,05	0,42 ± 0,05
20:4n6	1,24 ± 0,02	1,23 ± 0,06	1,31 ± 0,05	1,33 ± 0,04
20:5n3	11,63 ± 0,09	10,77 ± 1,75	11,48 ± 0,93	10,91 ± 0,06
22:6n3	14,07 ± 0,44	13,50 ± 2,69	14,67 ± 2,30	14,34 ± 0,03
Total PUFA	36,86 ± 0,20	35,64 ± 4,13	38,03 ± 3,20	37,96 ± 0,17
∑n-3[1]	26,97 ± 0,29	25,64 ± 4,43	27,73 ± 3,29	27,30 ± 0,05
∑n-6[1]	9,89 ± 0,09	10,00 ± 0,30	10,33 ± 0,10	10,66 ± 0,12
∑n-3[1]/∑n-6	2,73 ± 0,06	2,57 ± 0,52	2,69 ± 0,34	2,56 ± 0,02
∑n-3 HUFA	25,69 ± 0,35	24,28 ± 4,44	26,15 ± 3,23	25,64 ± 0,04
18:1n9[2]/DHA	1,08 ± 0,04	1,17 ± 0,20	1,20 ± 0,15	1,27 ± 0,01

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n=6).
[1] Incluidos los ácidos elaidico y oleico.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales.

	Dietas experimentales			
	L00	**L10**	**L15**	**L20**
Aminoácidos				
A. Aspártico	3,73	3,55	3,67	3,61
A. Glutámico	6,52	6,44	6,32	5,93
Hidroxiprolina	0,28	0,16	0,19	0,17
Serina	1,93	2,55	2,85	3,30
Glicina	2,44	2,46	2,49	2,62
Histidina	1,38	1,00	1,29	1,05
Arginina	2,68	2,73	2,70	2,75
Treonina	1,76	1,75	1,76	1,98
Alanina	2,70	2,55	2,50	2,40
Prolina	2,41	2,90	2,94	3,18
Tirosina	1,66	1,65	1,63	1,51
Valina	2,17	2,34	2,24	2,17
Metionina	1,31	1,15	0,98	0,87
Isoleucina	1,94	1,93	1,82	1,69
Leucina	3,83	3,93	3,83	3,65
Fenilalanina	2,00	2,08	2,05	2,07
Lisina	2,85	2,43	2,68	2,29

Los datos se expresan en g/100g de dieta en peso húmedo.

4.2.3 Estudio de coeficientes de digestibilidad aparente (CDA)

Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas se determinaron mediante un método de cuantificación indirecto con de Cr_2O_3. En capítulo II, metodología general, se describe detalladamente los estanques y las técnicas utilizada para esta evaluación. Se utilizaron 65 peces por cada estanque, la alimentación fue ad libitum una vez al día. Las heces eran recolectadas diariamente de cada estanque y congeladas para su posterior análisis. La digestibilidad de cada dieta fue evaluada en triplicado.

4.2.4 Mediciones zootécnicas

Después de 102 días de alimentación, en los cuatro tratamientos se evaluó sobrevivencia, crecimiento (SGR, TGC, % ganancia en peso), tasa y eficiencia de conversión (FCR y EF). También se evaluó la eficiencia de la

proteína a través de la razón de eficiencia proteica (PER) y el valor productivo de la proteína (PPV). Para medir el efecto de las dietas sobre la condición fisiológica del pez se evaluó el índice de condición y el índice hepatosomático (HSI). La metodología de muestreo mensual y las ecuaciones utilizadas para calcular todos los parámetros e índices descritos anteriormente son entregadas en el capítulo II (metodología general).

4.2.5 Análisis químicos

La composición proximal (proteína, extracto etéreo, fibra, cenizas y humedad) de las dietas experimentales, heces y carcasa fueron determinados de acuerdo a los métodos descritos por la AOAC (1998), los resultados son calculados en base seca, excepto el análisis de la carcasa que se entrega en base húmeda. El extracto no nitrogenado fue calculado por diferencia. El aporte de energía dietario fue estimado asumiendo un contenido energético de 23,6, 37,7 y 16,7kJ g^{-1}, para las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente.

Los lípidos totales fueron extraídos desde las muestras de músculo y de alimento mediante el método de Folch *et al*., (1957). Los ácidos grasos, como esteres metílicos fueron separados y cuantificados en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo HP6890 GC System. El perfil de aminoácidos de las dietas fue realizado en los laboratorios de Fundación Chile (Talcahuano-Chile). Detalles de la metodología analítica pueden ser encontrados en el capítulo II, metodología general.

4.2.6 Análisis histológicos

Muestras de hígado fueron fijadas en Bouin alcohólico, deshidratadas en etanol e incluidas en parafina. Las secciones cortadas (4-6µm) fueron

teñidas utilizando los métodos de hematoxilina y eosina, para luego ser observadas al microscopio.

4.2.7 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados utilizando el sottware Statistica versión 5.0). La diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos dietéticos fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias se compararon mediante el test de Tukey. Detalles del análisis estadístico se describen en el capítulo II.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Crecimiento y rendimientos productivos

Durante las 12 semanas de experimentación, todas las dietas experimentales fueron bien aceptadas por los peces. La sobrevivencia fue cercana al 95% para todos los tratamientos.

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos por los diversos índices y parámetros productivos estudiados. El uso del lupino en dietas extruídas, independiente de su nivel de incorporación (10%, 15% y 20%), presenta una respuesta similar de crecimiento a la obtenida por la dieta control. El peso medio final para las dietas se distribuyó entre los 236g (Dieta Control) a 260g (Dieta L20), no evidenciándose diferencias significativas ($P>0.05$).
El crecimiento de los peces expresado en términos de porcentaje de incremento en peso, no presentó diferencias estadísticas, los valores alcanzados fueron mayores al 258%. De igual modo, cuando se compararon los incrementos en biomasa no se encontraron diferencias entre los peces alimentados con las dietas experimentales y el control. En cuanto al consumo diario de alimento, no se observaron diferencias, mostrando valores muy homogéneos para todas las dietas. El factor de

conversión (FC) fue similar para todos los tratamientos, encontrándose valores medios de 1,0 para las dietas L00, L10 y L20 y de 1,16 para la dieta L15. La eficiencia del factor de conversión (EF), presenta valores que oscilan entre 86,54% y 99,62%, siendo la dieta L-15 la de menor eficiencia de conversión como respuesta al mayor FCR presente entre las dietas, sin embargo no presentan diferencias significativas (P>0,05) con los demás tratamientos.

Tabla 4. Crecimiento y rendimientos productivos en trucha arco iris alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

	Dietas Experimentales			
Parámetro	**L00**	**L10**	**L15**	**L20**
Peso Inicial (g)	63,0 ± 1,9	61,2 ± 2,7	62,97 ± 1,6	77,4 ± 12,8
Peso Final (g)	236,1 ± 3,0	251,3 ± 10,2	242,8 ± 18,5	260,8 ± 23,3
% Incremento en Peso	274,7 ± 3,6	310,6 ± 5,7	285,3 ± 21,4	240,3 ± 29,3
Biomasa Inicial (g)	2.919,2 ± 36,4	2.874,0 ± 64,6	2.875,8 ± 64,1	3.446,3± 490,4
Biomasa Final (g)	10.229 ± 93,9	10.807 ± 1022,9	10.086,7 ± 188,6	10.939 ± 757,1
Incremento en Biomasa (g)	7.762,9 ± 131,2	8.440,5 ± 576,1	7621,78 ± 297,2	7.865,1 ± 292,1
Consumo alimento (g/día)	81,3 ± 8,0	83,0 ± 4,1	86,5 ± 5,7	78,4± 1,0
FCR	1,1 ± 0,12	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0
FE (%)	94,3 ± 10,5	99,6 ± 2,8	86,5 ± 2,7	98,4 ± 2,8
S.G.R. (%)	$1,5 \pm 0,0^{ab}$	$1,6 \pm 0,1^{a}$	$1,5 \pm 0,0^{ab}$	$1,4 \pm 0,1^{b}$
T. G. C.	$0,16 \pm 0,00^{ab}$	$0,17 \pm 0,01^{a}$	$0,16 \pm 0,01^{ab}$	$0,15 \pm 0,00^{b}$
P.E.R.	2,09 ± 0,23	2,12 ± 0,06	1,86 ± 0,06	2,17 ± 0,1
P.P.V (%)	$25,7 \pm 2,4^{ab}$	$29,6 \pm 2,4^{a}$	$20,5 \pm 1,2^{c}$	$23,6 \pm 0,4^{bc}$

Los valores son el promedio con una desviación estándar de tres replicas.
Valores con exponentes diferentes dentro de cada fila denotan diferencias significativas (P<0.05).

Al término del experimento la tasa de crecimiento específica (SGR) y el factor de crecimiento termal (T. G. C) mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Para ambos parámetros la dieta L10 fue la que mostró los más altos índices, mientras que la dieta L20 los más bajos, con diferencias altamente (P<0,05) significativa entre ellas. No obstante lo anterior, la dieta L10 no se diferenció de las dietas L00 y L15, del mismo modo la dieta L20 no se diferenció de L15 y L00.

La razón de eficiencia proteica (PER) varió 1,9% (Dieta L15) y 2,2% (Dieta L20), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (P>0,05). Mientras que con el valor productivo de la proteína (PPV), el valor más bajo se obtuvo con la dieta L15 y el valor más alto con la dieta L10, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

4.3.2 Composición corporal de los peces

La composición corporal e índices hepatosomáticos (HSI) iniciales y finales de los peces utilizados en el presente experimento son mostrados en la Tabla 5. En general, la inclusión de la harina de lupino en la dieta, no afectó en forma significativa la composición proximal de los peces (P>0,05). No obstante, al finalizar la experimentación, todos los tratamientos presentan una disminución en el contenido de materia seca y cenizas (P<0,05), respecto a la composición corporal inicial, producto de un aumento en el contenido de agua durante este período.

Los HSI no difirieron entre los peces alimentados con las distintas dietas, todos los valores entorno a 1,0 sin embargo, estos valores son significativamente menores (P<0,05) en relación a los tomados al iniciar el experimento.

Tabla 5. Composición corporal e índices hepatosomáticos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con diferentes dietas experimentales.

Composición Proximal (%)	Inicial	Dietas experimentales			
		L00	L10	L15	L20
Materia seca	28,29^{a}	23.77 ± 0.92^{cb}	25.37 ± 0.65^{ac}	21.27 ± 1.72^{b}	23.98 ± 0.98^{cb}
Proteína[1]	18,88^{a}	13.34 ± 0.81^{bc}	14.96 ± 1.58^{b}	11.40 ± 0.37^{c}	13.09 ± 0.71^{bc}
Lípidos[1]	5,99^{a}	8.66 ± 0.98^{ab}	10.27 ± 1.37^{ab}	10.59 ± 1.26^{b}	7.90 ± 0.29^{b}
Cenizas[1]	2,66^{a}	1.63 ± 0.35^{b}	2.07 ± 0.11^{ab}	1.41 ± 0.27^{b}	1.99 ± 0.18^{ab}
IHS	1.9 ± 0.32^{a}	1.1 ± 0.27^{b}	1.0 ± 0.18^{b}	1.1 ± 0.12^{b}	1.1 ± 0.23^{b}

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 3).
^{a,b,c} Valores en una misma fila con distinto superíndice son significativamente diferentes (P<0,05).
[1] Los datos son entregados en base húmeda.

4.3.3 Estudio histológico

La histología de los hígados de aquellos peces que habían sido alimentados con las dietas que incluían harina de lupino entera, fueron similares a la dieta control L00 (Figura 1b, 1c, 1d y 1e). Al comparar la estructura de los hepatocitos de los peces iniciales (Figura 1a) con la de los peces al final del ensayo se puede observar en todos los tratamientos se presentan alteraciones por la infiltración grasa de los hepatocitos.

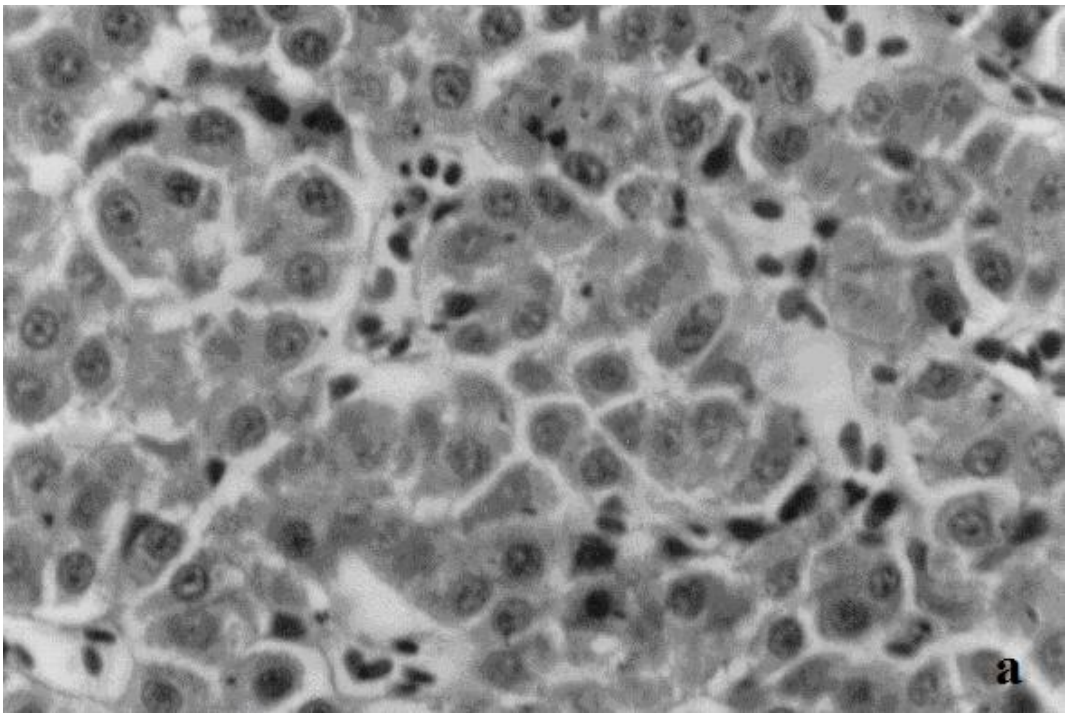


Figura 1a. Tejido hepático de los peces previos a la aplicación de los tratamientos. Aumento 40X (muestra inicial).

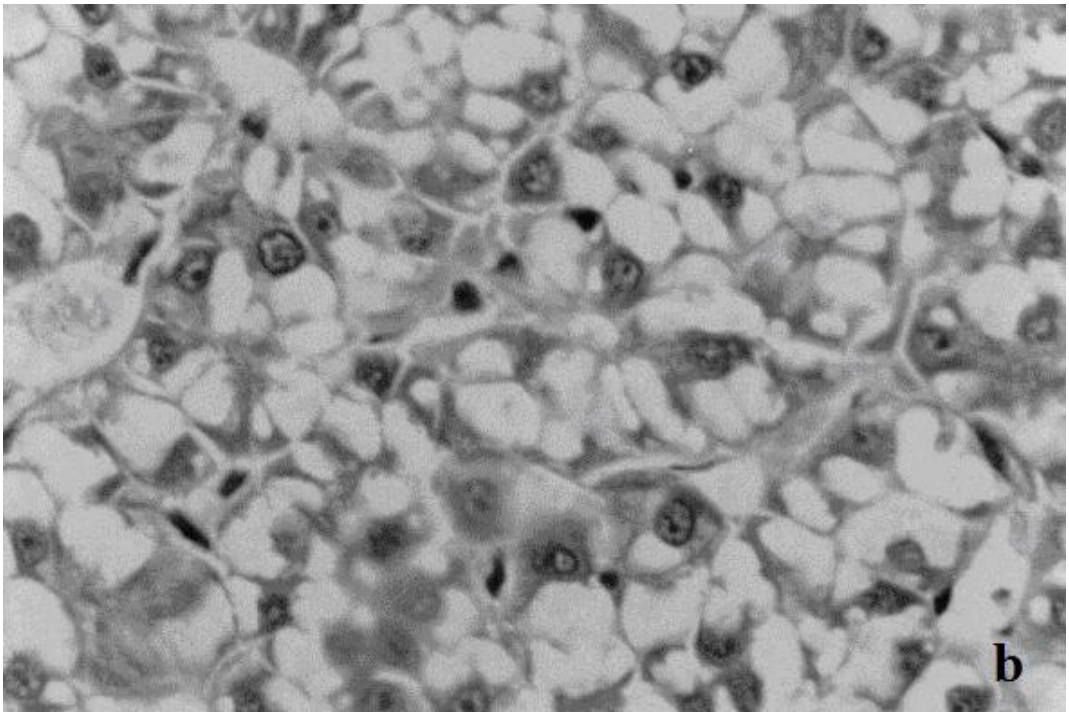


Figura 1b. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L00. Aumento 40X.

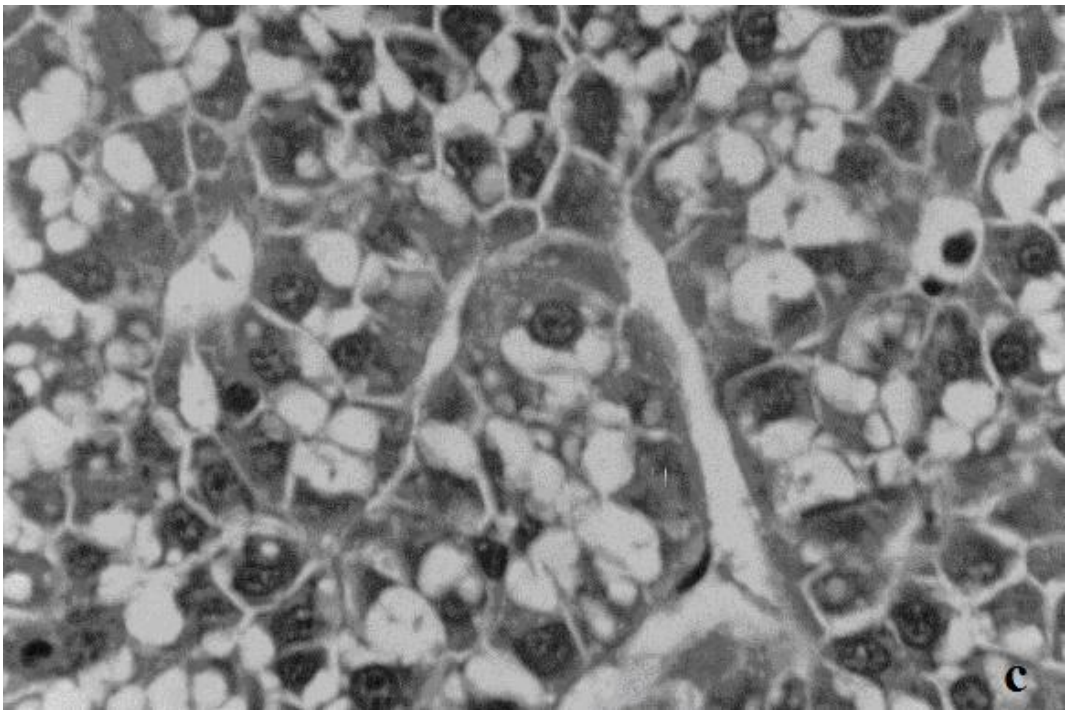


Figura 1c. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L10. Aumento 40X.

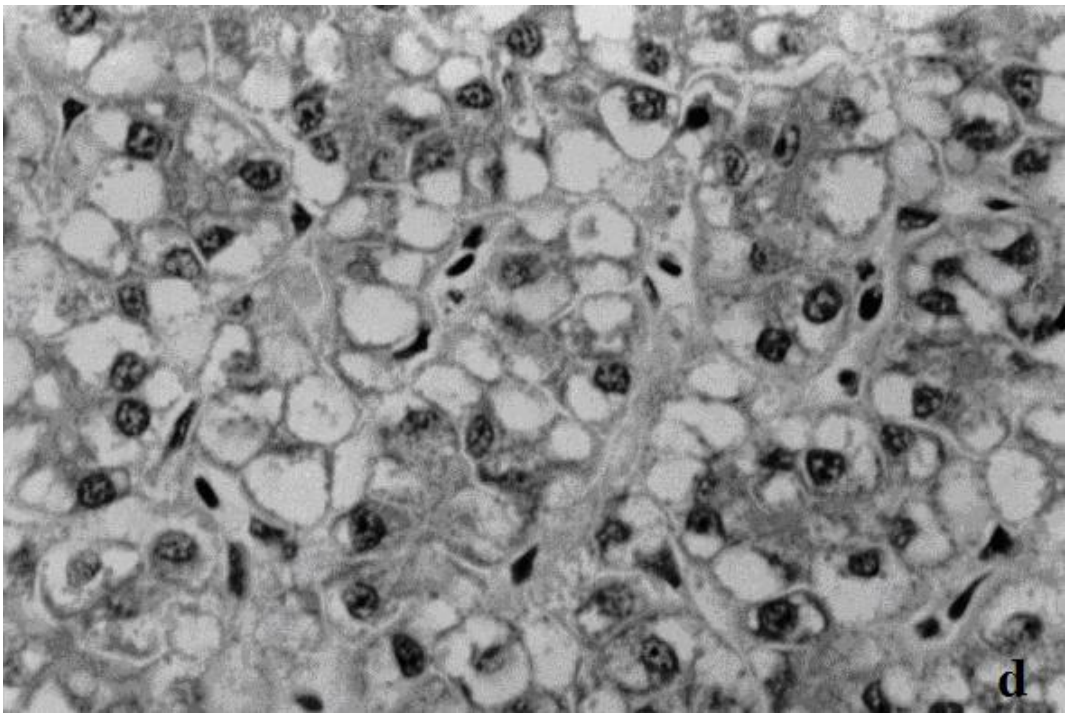


Figura 1d. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L15. Aumento 40X.

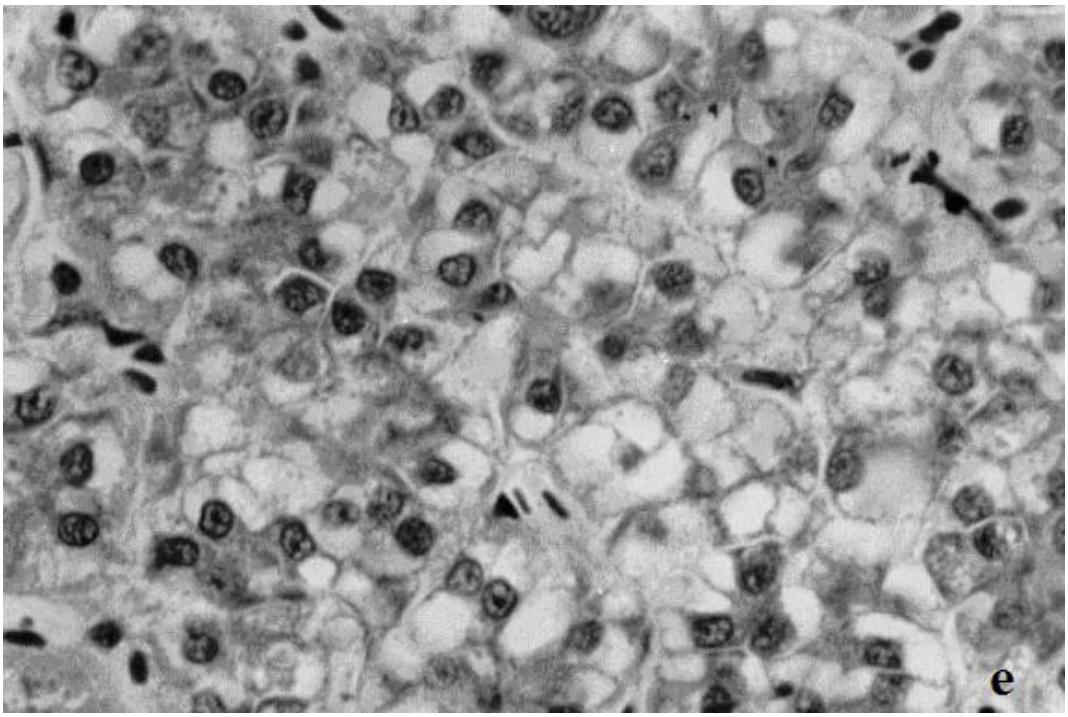


Figura 1e. Tejido hepático de los peces alimentados con la dieta L20. Aumento 40X.

4.3.4. Coeficiente de digestibilidad aparente de las dietas

Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) para las dietas evaluadas no mostraron diferencias significativas (P>0,05) entre ellas (Tabla 6). Los valores de CDA obtenidos para materia seca oscilaron entre 83.90% (L10) y 86.46% (L20). Los mayores CDA corresponden a los lípidos, seguidos por proteína. Mientras que los menores coeficientes fueron obtenidos por los carbohidratos.

Tabla 6. Coeficiente de digestibilidad aparente y energía digestible para las dietas experimentales.

Nutrientes	L00	L10	L15	L20
Materia seca	84,80±1,83	83,90±0,96	86,88±1,77	86,46±1,38
Proteína	92,77±0,65	92,23±0,36	94,32±0,74	94,35±0,71
Lípidos	98,93±0,33	95,28±0,33	97,29±0,38	98,36±0,32
Carbohidratos	75,70±3,07	70,06±0,02	76,91±2,50	78,83±0,37
Energía Digestible (Mj/Kg)	22,66±0,24	22,51±0,08	22,74±0,02	22,12±0,12

% Promedio ± Desv. Estándar (n=3)

4.3.5 Composición de ácidos grasos en el músculo.

El perfil de ácidos grasos de músculo de trucha arco iris; al inicio y al final del ensayo se muestra en la tabla 7. La incorporación de la harina de lupino entera en las dietas, muestra una tendencia a la disminución de los ácidos grasos saturados totales (*SAFA*) en la dieta mientras aumenta el nivel de incorporación de lupino (Figura 2), tendencia que se observa más marcada en los SAFA del músculo, la mayor diferencia porcentual entre el nivel de la dieta y el músculo se obtuvo en el tratamiento L00 (5,7%). Sin embrago no se encontraron diferencias significativas (P>0,05) entre el nivel de SAFA del músculo para los distintos tratamientos, ni con el nivel de inicial de SAFA del músculo previo al ensayo. En este grupo, el ácido graso mas abundante es el ácido palmítico (16:0), el que presenta una tendencia a disminuir su contenido, conforme aumenta el nivel de lupino dietario, sin embargo, en ningún caso este aumento es significativo (P>0,05).

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos presentes en el músculo de trucha arco iris alimentado con las diferentes dietas experimentales (g/100g ácidos grasos detectados). Lípidos totales expresados en peso humedo.

	Inicial	L00	L10	L15	L20
% Lípidos totales	1,30 ± 0,36^{a}	2,25 ± 1,85^{a}	4,34 ± 0,78^{a}	4,66 ± 2,08^{a}	5,34 ± 4,07^{a}
Ácidos Grasos Saturados					
12:0 Á. Láurico	0,00 ± 0,00^{a}	0,10 ± 0,17^{a}	0,05 ± 0,09^{a}	0,04 ± 0,09^{a}	0,06 ± 0,08^{a}
14:0 Á. Mirístico	3,03 ± 0,62^{a}	5,89 ± 0,42^{b}	6,41 ± 0,55^{b}	5,70 ± 0,49^{b}	5,43 ± 0,59^{b}
15:0 Á. Pentadecanoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,61 ± 0,24^{b}	0,54 ± 0,32^{b}	0,61 ± 0,06^{b}	0,60 ± 0,08^{b}
16:0 Á. Palmítico	28,24 ± 5,00^{a}	28,13 ± 2,97^{a}	25,64 ± 1,19^{ab}	22,88 ± 0,99^{ab}	21,78 ± 2,29^{b}
17:0 Á. Heptadecanoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,69 ± 0,10^{b}	0,84 ± 0,31^{b}	0,75 ± 0,44^{b}	0,58 ± 0,14^{b}
18:0 Á. Esteárico	7,06 ± 0,91^{a}	6,41 ± 1,43^{ab}	4,98 ± 0,53^{a}	4,68 ± 0,28^{b}	4,47 ± 0,65^{b}
20:0 Á. Araquídico	0,00 ± 0,00^{a}	0,24 ± 0,12^{b}	0,32 ± 0,04^{b}	0,27 ± 0,15^{b}	0,33 ± 0,08^{b}
21:0 Á. Henicosanoico	0,67 ± 0,15^{a}	0,89 ± 0,09^{b}	1,00 ± 0,05^{b}	1,21 ± 0,11^{b}	1,25 ± 0,13^{b}
22:0 Á. Behénico	0,00 ± 0,00^{a}	0,38 ± 0,17^{ac}	0,23 ± 0,12^{acb}	0,11 ± 0,12^{bc}	0,15 ± 0,12^{b}
23:0 Á. Tricosanoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,67 ± 0,20^{b}	0,82 ± 0,05^{b}	0,89 ± 0,10^{b}	0,95 ± 0,10^{b}
24:0 Á. Lignocérico	0,00 ± 0,00^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,05 ± 0,12^{a}	0,18 ± 0,16^{a}	0,00 ± 0,00^{a}
Total de SAFAs	**39,01 ± 6,68**^{a}	**44,00 ± 4,67**^{a}	**38,91 ± 2,09**^{a}	**37,31 ± 1,09**^{a}	**35,60 ± 2,70**^{a}
Ácidos Grasos Monoinsaturados					
14:1 Á. Miristoléico	0,00 ± 0,00^{a}	0,25 ± 0,24^{a}	0,24 ± 0,30^{a}	0,05 ± 0,12^{a}	0,00 ± 0,00^{a}
15:1 Á. Pentadecenoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,17 ± 0,22^{a}	0,11 ± 0,15^{a}	0,02 ± 0,05^{a}
16:1 Á. Palmitoléico	3,62 ± 0,33^{a}	5,94 ± 0,64^{b}	6,19 ± 0,36^{b}	6,71 ± 0,47^{b}	6,33 ± 0,68^{b}
17:1 Á. Heptadecenoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,80 ± 0,06^{b}	0,84 ± 0,05^{b}	0,93 ± 0,08^{b}	0,84 ± 0,15^{b}
18:1n9t Á. Elaidico	14,12 ± 0,44^{a}	17,06 ± 0,78^{b}	16,95 ± 1,14^{b}	19,25 ± 1,14^{bc}	19,92 ± 1,02^{c}
18:1n9c Á. Oléico	2,83 ± 0,52^{a}	2,81 ± 0,11^{a}	2,88 ± 0,08^{a}	2,99 ± 0,07^{a}	3,19 ± 0,14^{a}
20:1n9 Á. Eicosenoico	0,89 ± 0,19^{a}	1,33 ± 0,68^{a}	1,55 ± 0,17^{a}	1,34 ± 0,67^{a}	1,85 ± 0,21^{a}
22:1n9 Á. Erúcico	0,00 ± 0,00^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,02 ± 0,05^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,32 ± 0,49^{a}
24:1n9 Á. Nervónico	0,00 ± 0,00^{a}	0,40 ± 0,06^{b}	0,36 ± 0,21^{b}	0,37 ± 0,17^{b}	0,23 ± 0,24^{b}
Total de MUFAs	**21,45 ± 0,21**^{a}	**28,59 ± 1,64**^{b}	**29,20 ± 1,50**^{b}	**31,74 ± 1,83**^{b}	**32,69 ± 2,11**^{b}
Ácidos Grasos Poliinsaturados					
18:2n6t Á. Linolélaidico	0,00 ± 0,00^{a}	0,80 ± 0,08^{b}	0,86 ± 0,08^{b}	0,73 ± 0,43^{b}	0,95 ± 0,17^{b}
18:2n6c Á. Linoléico	6,65 ± 0,11^{a}	3,54 ± 0,26^{bc}	3,42 ± 0,18^{b}	3,85 ± 0,21^{bc}	4,10 ± 0,26^{c}
18:3n3 Á. Linolénico	1,00 ± 0,01^{a}	0,91 ± 0,44^{a}	0,85 ± 0,04^{a}	1,19 ± 0,23^{a}	1,19 ± 0,10^{a}
18:3n6 Á. g-linolénico	0,00 ± 0,00^{a}	0,40 ± 0,22^{a}	0,23 ± 0,12^{a}	0,13 ± 0,15^{a}	0,16 ± 0,06^{a}
20:2 Á. Eicosadienoico	0,63 ± 0,21^{a}	0,63 ± 0,13^{b}	0,63 ± 0,16^{ab}	0,45 ± 0,16^{ab}	0,36 ± 0,07^{ab}
20:3n3 Á. Eicosatrienoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,20 ± 0,31^{a}	0,08 ± 0,18^{a}	0,06 ± 0,10^{a}	0,07 ± 0,08^{a}
20:3n6 Á. Homo-γ-Linolénico	0,00 ± 0,00^{a}	0,31 ± 0,26^{ab}	0,48 ± 0,26^{b}	0,35 ± 0,20^{ab}	0,37 ± 0,22^{ab}
20:4n6 Á. Araquidónico	2,17 ± 0,93^{a}	1,05 ± 0,06^{a}	0,86 ± 0,38^{a}	1,12 ± 0,18^{a}	0,82 ± 0,35^{a}
20:5n3 Á. Eicosapentaenoico	6,73 ± 0,04^{a}	6,08 ± 1,01^{a}	6,68 ± 0,43^{a}	7,46 ± 0,28^{a}	7,46 ± 0,57^{a}
22:2 Ácido Docosadienoico	0,00 ± 0,00^{a}	0,06 ± 0,15^{a}	0,01 ± 0,02^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,00 ± 0,00^{a}
22:6n3 A. Docosahexaenoico	22,37 ± 7,69^{a}	13,43 ± 2,92^{b}	15,82 ± 1,52^{ab}	15,61 ± 1,62^{ab}	16,24 ± 1,64^{ab}
Total de PUFAs	**39,54 ± 6,89**^{a}	**27,41 ± 3,43**^{b}	**29,91 ± 1,72**^{b}	**30,95 ± 1,51**^{b}	**31,7 ± 2,13**^{ab}
∑n-3	30,10 ± 7,72^{a}	20,62 ± 3,53^{b}	23,43 ± 1,81^{b}	24,32 ± 1,81^{b}	24,95 ± 1,90^{b}
∑n-3 HUFAs	29,10 ± 7,73^{a}	19,71 ± 3,84^{b}	22,58 ± 1,81^{b}	23,13 ± 1,72^{b}	23,76 ± 1,87^{b}
∑n-6	9,44 ± 0,83	6,73 ± 0,17	6,48 ± 0,18	6,63 ± 0,64	6,76 ± 0,31
∑n-3/∑n-6	3,24 ± 1,10^{a}	3,07 ± 0,53^{a}	3,62 ± 0,35^{a}	3,71 ± 0,60^{a}	3,69 ± 0,21^{a}
C18:1n9*/DHA	0,81 ± 0,28^{a}	1,53 ± 0,30^{bc}	1,27 ± 0,17^{ac}	1,44 ± 0,23^{bc}	1,44 ± 0,16^{bc}

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 6).
^{a,b,c,d} Valores en una misma fila con distinto superíndice son significativamente diferentes (P<0.05).
* Incluidos los ácidos elaídico y oléico.

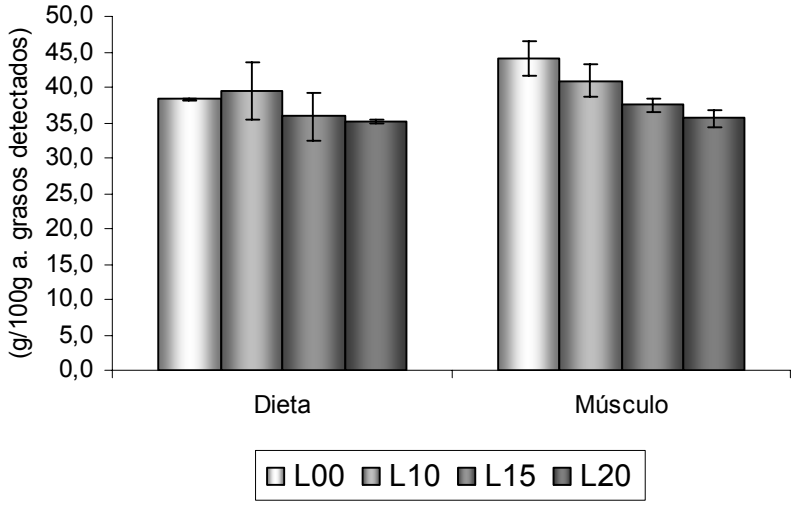


Figura 2. Concentración total de ácidos grasos saturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

Los ácidos grasos mono-insaturados en el músculo de trucha arco iris muestran una tendencia a aumentar con forme aumenta el nivel de incorporación de lupino en las dietas, siguiendo la tendencia de concentración de MUFA de las propias dietas. No obstante, las concentraciones de MUFA del músculo expresadas como porcentajes de áreas no mostraron diferencias significativas (P>0,05) entre las dietas con lupino y la dieta L00 (control).

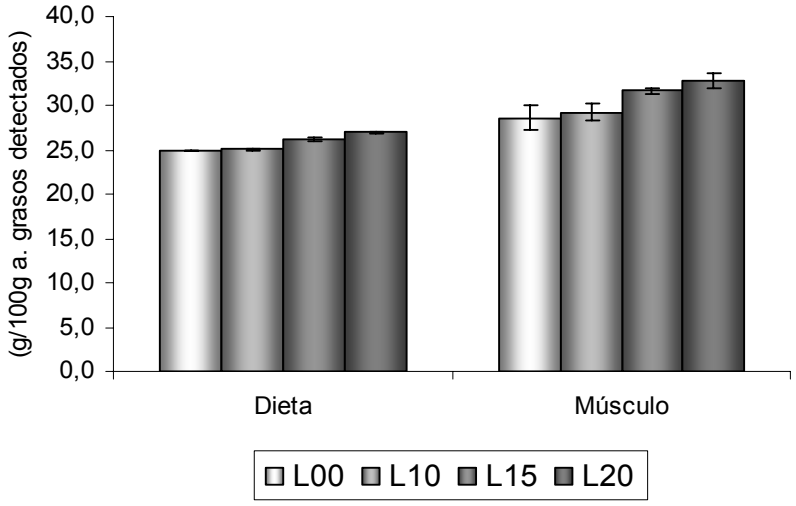


Figura 3. Concentración total de ácidos grasos mono-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

Por el contrario, al ser comparados con la muestra inicial se observó un aumento significativo (P<0.05) en el contenido final del músculo (Figura 3), debido al incremento también significativo (P<0,05) de los ácidos palmitoléico (16:1) y elaídico (18:1n9t). Si se suman la concentraciones de las configuraciones cis y trans del 18:1n9 (oleico y elaidico), se puede observar (Figura 5a) un incremento significativo (P<0,05) de la concentración de este ácido graso cuando aumenta el nivel de incorporación de lupino.

La concentración total de ácidos grasos poli-insaturados (*PUFA*) del músculo tienden a incrementar ligeramente conforme aumenta el nivel de incorporación de lupino en la dieta (Figura 4), aunque estas concentraciones no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos (P>0,05). No obstante lo anterior, la concentración inicial del músculo fue significativamente mayor (P<0,05) que la concentración del músculo de los tratamientos L00, L10 y L15, pero sin diferencias con el tratamiento L20 (Figura 4). La concentración total de ácidos poli-insaturados de la serie n-6 en el músculo no presentó diferencias significativas (P>0,05) entre los tratamientos dietarios (Tabla 7), sin embargo la concentración de los ácidos linoléico (18:2n6c) y araquidónico (22:4 n6), mostró una significativa (P<0,05) disminución en relación a la concentración inicial del músculo (Figura 5b y 5c).

La concentración total de ácidos poli-insaturados de la serie n-3 en el músculo no mostró diferencias significativas entre los tratamientos dietarios, sin embargo todos ellos tuvieron concentraciones significativamente (P>0,05) más bajas que el contenido inicial (Tabla 7). El ácido linolénico (18:3n3), osciló entre 0.85% (L10) y 1.19% (L20), sin diferencias significativas (P>0,05) entre los tratamientos ni con la concentración inicial del músculo, aunque con niveles más bajos que lo observado en las dietas (Figura 5d). La concentración del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n3), varió entre 6.08% (L00) y 7.5% (L20),

sin diferencia significativa (P>0,05) entre los tratamientos, ni con la concentración inicial del músculo, pero con niveles más bajos que las dietas (Figura 5e).

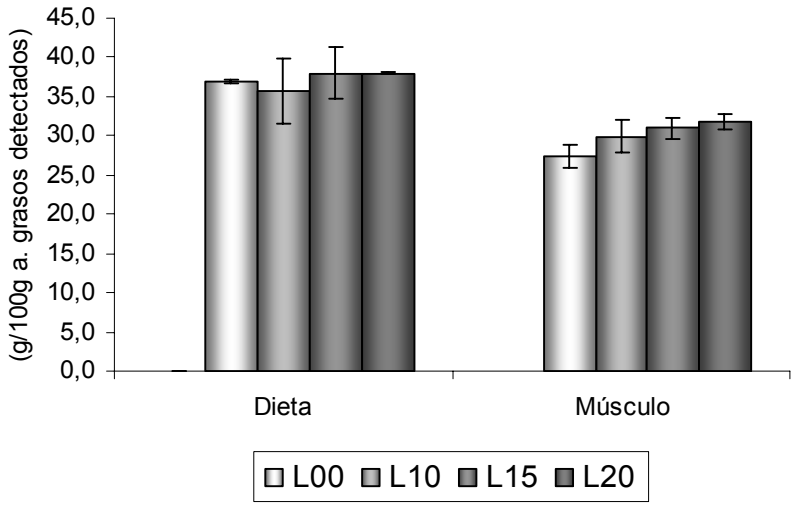


Figura 4. Concentración total de ácidos grasos poli-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

La concentración del ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 n3) en el músculo no mostró diferencia entre todos los tratamientos, la concentración inicial del músculo fue sólo significativamente superior (P<0,05) al tratamiento L00. Las concentraciones de DHA medida en el alimento fueron estadísticamente similares a la de los cuatro tratamiento (Figura 5f).

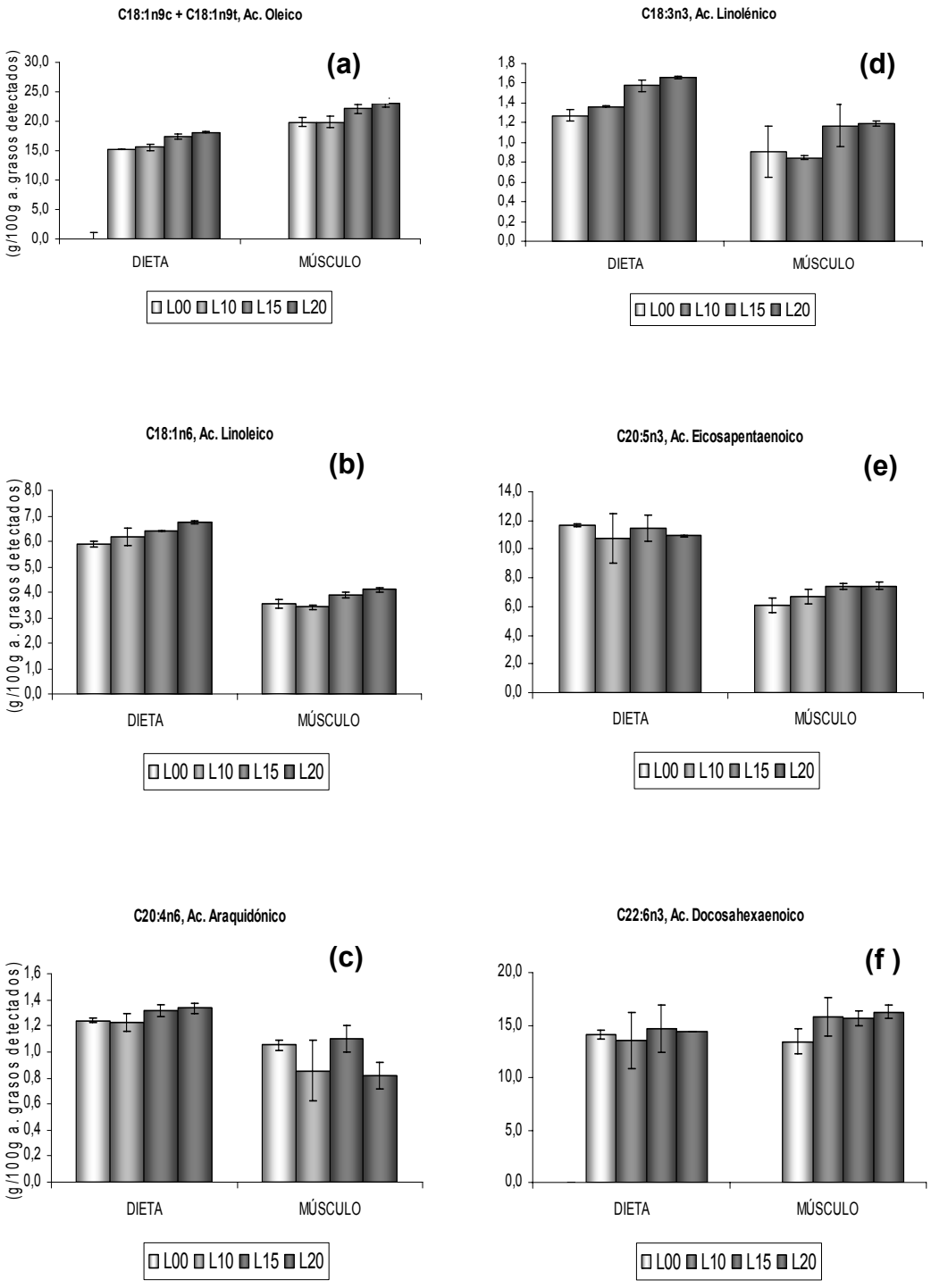


Figura 5. Concentración de algunos ácidos grasos en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

A pesar de la disminución en el total de *PUFA* de la serie n6, la relación n3/n6 no fue afectada (P>0,05), con los tratamientos dietéticos. Por el contrario, la relación C18:1n9/DHA en el músculo, aunque muestra valores significativamente semejantes (P>0,05) entre los tratamientos dietarios, estos coeficientes fueron significativamente mayores (P<0,05), al ser comparados con el valor inicial del músculo (Tabla 7).

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra el potencial de la harina de lupino como ingrediente proteico para dietas comerciales de salmónidos, coincidiendo los resultados con estudios realizados anteriormente (De la Higuera *et al*., 1988; Hughes, 1991; Morales *et al*., 1994; Burel *et al*., 1998; Burel *et al*. 2000a; Carter & Hauler, 2000; Farhangi & Carter, 2001; Glencross *et al*., 2002, 2003, 2004, 2007).

En términos generales los crecimientos obtenidos por los peces alimentados con lupino, independientes de su nivel de inclusión, son similares a los conseguidos por la dieta control. Los mayores incrementos de peso fueron alcanzados por los peces alimentados con la dieta con 10% de incorporación de lupino (L10), lo que concuerda con investigaciones de realizadas previamente por Borquez & Alarcón (2002) y Burel *et al*. (1998), que han reportado que dietas con inclusiones de lupino presentan índices de crecimiento superiores a los logrados por aquellas a base de harina de pescado.

Al igual que otras harinas vegetales, usadas comúnmente en la formulación de alimentos para salmónidos, la harina de lupino también presenta algunos factores anti-nutricionales, uno de los más relevantes son los alcaloides (Tacon, 1997), los que afectan la palatabilidad y la ingesta del alimento (Francis *et al*., 2001). Sin embargo, en el presente estudio los buenos niveles de ingesta de los alimentos no evidencian que la harina de

lupino haya afectado la palatabilidad del alimento. La variedad de lupino (Hamburgo, 0,012% alcaloides) utilizada es la denominada dulce, es decir con niveles de alcaloides menores que 0,05% (Petterson *et al*. 1997).

Aunque la ganancia en peso generalmente decrece al incrementarse el nivel de inclusión de lupino (De la Higuera *et al.* 1988 y Hughes, 1991), los bajos niveles de inclusión en las dietas utilizadas en este experimento no parecen afectarlo. Según Farhangi & Carter (2001) y Burel *et al.* (1998) solo inclusiones de *Lupinus albus* sobre un 40% en dietas suplementadas con aminoácidos, disminuye la ganancia en peso en trucha arco iris.

La capacidad de la trucha arco iris de adaptarse dentro del primer mes de alimentación a dietas con proteínas vegetales (Refstie *et al* 1997), sería responsable de que los valores de SGR alcanzados por los peces fueran relativamente buenos, no obstante, ellos son menores a los reportados por Gouveia *et al.,* (1993) y Morales *et al*. (1994) al utilizar lupino en la dieta. Cabe recordar que en el presente estudio se uso semilla entera de lupino y no harina descascara lo que pudiera afectar la utilización digestiva de la dieta

Los TGC obtenidos en el experimento coincidieron con los valores normales reportados en bibliografía para trucha arco iris, los cuales se sitúan entre 0,153 y 0,203 (Bureau & Cho; 1999). Sustituciones con lupino no han demostrado efectos significativos sobre el TGC (Glencross *et al*. 2002), lo cual sugiere que los valores de TGC encontrados fueron independientes a las dietas ensayadas, aunque menores a los reportados en dichos trabajos. Estas diferencias podrían atribuirse también a factores genéticos (Glencross *et al*. 2003b) y ambientales (Bureau & Cho, 1999).

La composición proximal de la carcasa en los peces, no evidenció influencia del régimen dietético, coincidiendo con los resultados de Hughes, (1991); Gouveia *et al*., (1993); Burel *et al*., (1998); Bórquez and Alarcón,

2002 y Carter & Hauler, (2000) aún cuando estos otros autores utilizaron niveles superiores de inclusión de harina de lupino. Sin embargo, los porcentajes de materia seca, proteína y lípidos encontrados en el presente estudio son menores a los estos autores. Contrariamente, Farhangi & Carter (2001) reportan una disminución en el contenido proteico, al incluir un 20% de lupino en el alimento, lo cual se explica por un aumento en el contenido de lípido de la carcasa, al incluir altos porcentajes de materias primas vegetales (Gomes *et al*., 1993). Respecto a la composición corporal inicial, las variaciones experimentado por los tratamientos como la disminución en el porcentaje de materia seca, producto del aumento de agua estaría relacionado a la fase juvenil, en este periodo la energía es utilizada para el crecimiento, reduciendo en consecuencia los niveles de lípido en la carcasa, permitiendo el aumento de agua en los tejidos; este comportamiento es común en peces silvestres (Shearer, 1994).

El uso de leguminosas y cereales en la nutrición de peces puede tener efectos adversos sobre el hígado, después de largos periodos de alimentación, debido a un incremento de los depósitos de glucógeno (Russell *et al*., 2001), en respuesta a una mayor activad de gluconeogénesis, la que según Farhangi y Carter (2001) aumenta con el incremento en los niveles de inclusión de lupino. El aumento de la gluconeogénesis, ha sido explicado por la baja digestibilidad de carbohidratos (Brauge *et al*., 1994), antecedentes que no concuerdan con los resultados de digestibilidad de este estudio. No obstante lo anterior, en este estudio los HSI fueron similares entre todos los tratamientos, del mismo modo los valores obtenidos sugieren una buena condición de salud (Watanabe *et al*., 1994). La reducción de los IHS respecto al valor inicial, podría estar asociado al cambio de régimen dietario como también a la densidad de cultivo (Montero *et al*., 2001).

La sobrecarga lipídica exhibida por las células hepáticas no podría ser atribuible solamente al uso del lupino, ya que de igual forma se aprecia en

el control. El efecto de la inclusión dietaría de leguminosas como lupino (Robaina *et al*., 1995) y arveja (Rusell *et al*., 2001) se caracteriza por un aumento en los deposito de lípidos y una disminución del glicógeno en los hepatocitos. De igual forma otros factores como una deficiencia en HUFA dietario y una alta densidad de cultivo podrían provocar un aumento en de los depósitos lipídicos del hígado (Caballero *et al*., 2002 y Montero *et al*., 2001). Sin embargo, como se comentó anteriormente, estas alteraciones no afectaron los índices hepatosomáticos

Los CDA de la materia seca encontrados en esta investigación, son similares a los obtenidos en salmónidos en general (De la Higuera *et al*., 1988; Carter y Hauler 2000; Glencross *et al*., 2004; Glencross *et al*., 2004a) y en juveniles de turbot (Burel *et al*., 2000a), cuando se incluye harina de lupino en sus dietas, obteniéndose CDA sobre un 80%. Los valores para CDA de proteína obtenidos, no se diferencian significativamente de la dieta control, probablemente la baja presencia de factores anti-nutricionales, como inhibidores de la tripsina en el grano de lupino (Kaushik *et al*., 1995; Tacon, 1997b), así como el proceso de extrusión aplicado en la fabricación de las dietas, pudieron haber desactivado o reducido la presencia de este u otros factores anti-nutricionales que afecta la digestibilidad de las proteínas (Carter y Hauler, 2000). De igual forma, los CDA de lípidos no presentaron diferencias significativas entre las dietas, obteniéndose valores altos y concordantes con los obtenidos por Gouveia *et al*. (1993). La digestibilidad de los lípidos mejora cuando se reduce los ácidos grasos saturados en la dieta, aun cuando no significativo, la inclusión de lupino en las dietas mostró una tendencia hacia la disminución de SAFA (Figura 2).

A pesar de que la energía digestible de las leguminosas es considerada baja debido a su alto contenido de carbohidratos (Morales *et al*., 1994) los valores de energía digestible logrados en este experimento son similares a los reportados por Gomes *et al*. (1993), probablemente justificado por los altos valores de CDA de carbohidratos de todas las dietas.

La composición de ácidos grasos en el músculo de trucha arco iris esta directamente relacionado al perfil de ácidos grasos en las respectivas dietas. Observaciones realizadas anteriormente en diferentes especies de salmónidos (Watanabe, 1982; Bell *et al*., 1986; Gomes *et al*., 1993; Guillou *el al*., 1995; Henderson, 1996; Bell el al., 2001; Montero *et al*., 2001; Caballero *et al*., 2002) concuerdan con los resultados obtenidos. Estos cambios en el perfil de ácidos grasos del músculo ocurren entre 4 y 6 semanas, una vez iniciada la alimentación (Guillou *el al*., 1995).

Al incrementar la inclusión de lupino en las dietas, se advirtió una ligera disminución en el porcentaje total de SAFA. Este comportamiento es característico al utilizar harinas vegetales en las dietas, debido a que causan una reducción del ácido palmítico en el músculo (Gomes *et al*., 1993).

Las altas tasas de crecimiento de los salmones de cultivo son responsabilidad del uso de dietas de alta de energía, ricas en MUFA, principalmente el ácido oleico (Bell *et al*., 2001). Las concentraciones de MUFA se incrementan al utilizar lupino en el alimento, debido a que los ingredientes vegetales tienden a generar la acumulación del *18:1n9* en el músculo (Gomes *et al*., 1993; Guillou *el al*., 1995; Bell *el al*., 2001; Caballero el al., 2002). Esta acumulación es consecuencia de la limitada capacidad de desaturar el *18:1n9* en presencia de altos niveles dietarios de *18:3n3* o *18:2n6* (Storebakken *et al*., 2000b; Montero *et al*., 2001). Si bien estos trabajos no hacen referencia al tipo de isomero cuantificado al nombrar el *18:1n9,* el comportamiento descrito previamente por los autores correspondería al isomero *trans,* el ácido elaidico, el cual aumenta con el aumento del nivel de lupino en la dieta.

Otro efecto asociado con la inclusión de vegetales es el aumento en los n-6 PUFA en el músculo, los que son mayoritarios en los vegetales, al igual

que en la semilla de lupino (Yañes *et al*., 1983; Masson & Mella, 1985; Petterson *et al*., 1997), este incremento seria debido a una competencia enzimática entre el *18:2n6* y *18:3n3* (Storebakken et al., 2000b), de manera que al existir una alta cantidad de *18:2n6* dietario provoca una baja actividad de desaturación para la serie n3 y un aumento de los n-6 PUFA totales en el músculo. No obstante, con la inclusión de lupino en el alimento, los niveles de *18:2n6* en el músculo fueron similares al control, lo cual sugiere un mayor efecto en el metabolismo enzimático de los ácidos grasos *18:3n3* del aceite de pescado utilizado en la fabricación de los alimentos (Bell *et al*., 2001). De igual forma los niveles de *20:4n6* no variaron entre los tratamientos, este comportamiento manifiesta una carencia en la conversión del *18:2n6* a *20:4n6*, consecuencia de la competencia entre los PUFA de la serie n3 y n6 por las vías de saturación del hígado (Storebakken *et al*., 2000b, Bell *et al*., 2001).

La semilla de lupino, contiene un 9% de ácido linolénico (Yañes *et al*., 1983; Masson y Mella, 1985; Petterson *et al*., 1997) por lo cual al ser incluidas en las dietas podría contribuir a mantener constantes su contenido, como al igual los de EPA y DHA. Efectos adversos ocurren al utilizar otros ingredientes vegetales al disminuir el 18:3n3 en los tejidos (Gomes *et al*., 1993; Guillou *et al*., 1995; Bell *et al*., 2001; Caballero *et al*., 2002).

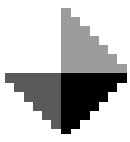
La existencia de una mayor cantidad de DHA en el músculo, en comparación al contenido en el alimento y la no variación de los niveles de DHA en los tratamientos dietarios, concuerdan con los estudios de Gomes *et al*. (1993) y Bell *et al*. (2001). Según estos autores, ambos fenómenos serian el resultado de una acumulación selectiva de DHA en el músculo, aunque exista una reducción de este en la dieta; esto se explica por una mayor tasa de desaturación en los hepatocitos al alimentar salmónidos con aceites vegetales (Tocher *et al*., 2001).

La reducción en los porcentajes iniciales de *n6* y *n3* PUFA, se debería a la calidad nutricional del alimento ingerido por los peces, previo al experimento (Sheader, 1994) o a cambios en el perfil de ácidos grasos producidos por el crecimiento (Sheridan *et al*., 1988).

A pesar de que la cantidad de lípidos aportada por el lupino es escasa, su elevada proporción de ácidos grasos de la serie *n6* podría desequilibrar la relación *n3*/*n6* (Robaina, 1998). Sin embargo, este coeficiente en el músculo, no se ve afectado por las dietas, debido a la abundancia de PUFA de la serie n3 aportado por el aceite de pescado y en parte compensado por la semilla de lupino, ambos ingredientes utilizados en los alimentos en este estudio. Los resultados obtenidos, son contrarios a los reportados al utilizar otras harinas vegetales, en los que se observa una reducción de la relación *n3*/*n6,* producto de un incremento del 18:2*n6* como también de un decrecimiento en el porcentaje de *n3* PUFA (Gomes *et al*., 1993).

Un indicador de la deficiencia de EFA dietaria usado comúnmente en peces es la relación *18:1n9* /*DHA* (Watanabe, 1982; Takeuchi *et al*., 1996; Furuita *et al*., 1996; Montero *et al*., 2001). No obstante, aunque los coeficientes fueron similares en todos los tratamientos, incluido el control, los valores fueron superiores a los calculados inicialmente, siendo mayores a 1.0, lo cual en peces marinos, evidencia un déficit en los EFA dietario (Furuita *et al*., 1996; Montero *et al*., 2001), resultado de la utilización de insumos vegetales en la fabricación de los alimentos, al elevar los niveles de ácidos eicosatrienoico y oleico (Watanabe, 1982).

Al utilizar la composición de ácidos grasos, como un indicador de la calidad de la carne para el consumo humano, el uso de la harina de lupino entera hasta un nivel de inclusión de 20%, no alteró de forma significativa su calidad nutricional.



CAPÍTULO V:

Experimento 3

INCORPORACIÓN DIETARIA DE ALTOS NIVELES DE GRANO ENTERO DE LUPINO BLANCO(*Lupinus albus*) EN DIETAS EXTRUIDAS PARA TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*): EFECTOS SOBRE LOS ÍNDICES PRODUCTIVOS, LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN EL MÚSCULO.

5.1 INTRODUCCIÓN

Los salmónidos, peces marinos y abulones han sido las especies de acuicultura mas estudiadas en relación a la utilidad del lupino como una posible fuente nutritiva (Glencross, 2001; Glencross et al. 2007). Según De la Higuera *et al.* (1998) es posible reemplazar hasta un 30% la harina de pescado por harina de lupino (suplementando lisina y metionina) y conseguir índices de producción y de utilización de la proteína óptimas en trucha arco iris. De igual forma, experimentos en salmón del atlántico (*Salmo salar*) muestran que el reemplazo de la harina de pescado por harina de lupino de hasta un 33% en dietas extruidas, no afecta el crecimiento de los peces (Carter y Hauler 2000).

Estudios realizados posteriormente por Faghangi & Carter (2001), señalan que la inclusión de un 40% de lupino en la dieta de trucha arco iris no presenta efectos significativos en el crecimiento o en la utilización de los nutrientes. La trucha arco iris utiliza la proteína del lupino tan eficazmente como la proteína de harina de pescado pero tiene una habilidad menor para utilizar la energía contenida en altos niveles de inclusión de lupino. Sin embargo, se ha comprobado que la incorporación de altos niveles de inclusión de lupino (superiores al 50%) en dietas extruidas provocarían en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), un aumento en la deposición de grasas, además de una reducción en el crecimiento (Burel *et al.* 1998).

Si bien, la utilización de bajas inclusiones de materias primas vegetales en la dieta, no manifiestan efectos inmediatos sobre los índices productivos y digestibilidad (Glencross *et al*., 2004), los altos niveles de inclusión pudieran afectar fisiológicamente al pez al modificar la composición de ácidos grasos del alimento (Storebakken et al., 2000b, Glencross et al. 2007). Por otra parte, la incorporación de altos niveles de proteoginosas en las dietas de salmónidos aportan un mayor nivel de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 y como consecuencia disminuyen los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 en los tejidos lo cual provocaría alteraciones en el valor nutricional del pez (Bell et al., 2001; Caballero et al. 2001; Torstensen et al., 2000). La harina de lupino contiene aproximadamente 9% de ácido graso linolénico (18:3n3) en sus lípidos, valor interesantemente alto en comparación a otras harinas vegetales, sin embargo, la presencia mayoritaria del ácido graso linoléico en el grano (Yánez et al., 1983), podría ocasionar problemas fisiológicos y metabólicos al ser incluidas en altos niveles en dietas comerciales para salmónidos.

La mayoría de los trabajos que han abordado la inclusión de altos niveles de lupino no han usado fórmulas comerciales donde se incorpora un ingrediente considerando variables nutricionales, de proceso y costo. Del mismo modo, las partidas de alimento han sido de pequeño volumen y fabricados en algunos casos en forma artesanal o en pequeños extrusores. El presente estudio parte de la incorporación de lupino en una fórmula comercial y el alimento es fabricado en una extrusora industrial a partir de grano de lupino entero, es decir entra al silo como grano entero con cáscara.

En el presente estudio se evalúa el efecto sobre los parámetros productivos, la utilización digestiva y la composición de los ácidos grasos en el músculo al incluir altos niveles (30, 40 y 50%) grano de lupino entero en dietas extruidas para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Adicionalmente, se evalúa la presencia de alteraciones en la histología del epitelio intestinal y deposición lipídica en el hígado.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Dietas

Fueron evaluadas 4 dietas extruidas, una dieta control, dieta comercial (L0) y tres dietas con inclusión de 30, 40 y 50% de lupino entero (L30, L40 y L50), todas fabricadas en la planta de Biomar Chile (Rancagua).

Las formulaciones se realizaron mediante el software FORMAT, considerando requerimientos nutricionales como los niveles mínimos de aminoácidos esenciales. Como restricciones de fabricación se estableció el mínimo porcentaje de almidón extruible y mínimo porcentaje de humedad. La formulación y composición proximal de las dietas se muestra en la Tabla 1. La formulación considera que la proteína del lupino reemplaza un 25; 33 y 42% de la proteína total de las dietas y aproximadamente un 50; 60 y 70% de las proteínas alternativas (Tabla 2). En las Tablas 3 y 4 se muestran el perfil de ácidos grasos y aminoácidos para las cuatro dietas experimentales, respectivamente.

Tabla 1. Formulación y composición de las dietas experimentales

	Dietas experimentales			
	L00	**L30**	**L40**	**L50**
Ingredientes (%)				
Harina de pescado[a]	40,00	35,00	30,00	25,00
Aceite de pescado[a]	14,52	13,62	13,40	13,16
Semilla entera de lupino[b]	0,00	30,00	40,00	50,00
Harina trigo industrial[c]	15,00	6,35	6,35	6,34
Maravilla desgrasada[d]	13,81	4,90	0,00	0,00
Harina de pluma[e]	12,26	8,54	10,75	10,25
Premix Biomar	0,50	0,50	0,50	0,50
Fosfato mono Ca[f]	0,03	0,57	1,05	1,43
L-Lisina[g]	0,02	0,05	0,19	0,31
DL-Metionina[g]	0,00	0,14	0,24	0,31
Composición Proximal Teórica (%)[h]				
Proteína bruta	45,00	45,00	45,00	45,00
Lípidos totales	20,00	20,00	20,00	20,00
Ceniza	7,52	6,90	6,17	5,12
Fibra bruta	1,92	4,13	4,71	5,83
Extracto libre de nitrógeno	14,60	15,00	15,10	15,00
Energía bruta (kj/kg)	11,00	9,00	9,00	9,00
Fósforo (%)	1,10	1,10	1,10	1,10
Metionina (%)	0,95	0,95	0,95	0,95
Lisina (%)	2,56	2,56	2,56	2,56
Energía bruta (Kj/Kg)	21,03	21,10	21,12	21,10
Composición Proximal Analítica (%)[h]				
Materia seca	91,89	92,77	91,90	91,12
Proteína bruta	49,13	52,77	52,70	48,44
Lípidos totales	25,81	25,41	24,37	22,30
Ceniza	8,53	7,76	7,24	7,10
Fibra bruta	3,17	2,45	2,67	5,84
Extracto libre de nitrógeno	13,36	11,62	13,02	16,33
Energía bruta (Kj/Kg)	24,09	24,49	24,30	23,05

[a]Aceite de pescado y Harina de pescado chilena, Super Prime, secada por vapor: 68% de proteína cruda y 12% lípido crudo; aceite de pescado chileno (ambos, Exapesca S.A., Talcahuano, Chile). [b]Lupino blanco (*Lupinus albus*) var. Hamburg (Sel Chile S.A. Temuco, Chile): 37,3% proteína cruda, 7,4% lípido crudo y alcaloides totales 0,012%. [c]Graneles Chile S.A. Santiago, Chile: 10% proteína cruda, 1% fibra. [d]Subproducto de la industria productora de aceite de maravilla (Graneles Chile S.A. Santiago, Chile): 46% proteína cruda, 2% lípido crudo y 8% fibra. [e]Subproducto de la industria de pollos (Terramar Chile S.A., Santiago, Chile): 82% proteína cruda y 6% de lípido crudo. [f]Aquafarma S. A. Chile: 22,7 %P. [g]Degussa, Alemania. [h]Los datos son expresados en base seca.

Tabla 2. Aporte porcentual de proteínas de las diferentes materias primas utilizadas en la formulación.

Parámetros	**Dietas experimentales**			
	L00	**L30**	**L45**	**L50**
PB Total dieta(g/kg)	451,0	449,0	448.0	447,0
PB ingredientes alternativos (g/kg)	179,0	211,0	244,0	277,0
Distribución PB según MM. PP. (%)				
Harina pescado	60,3	53,0	45,6	38,0
Grano lupino entero	0,0	24,9	33,3	41,7
Harina trigo	3,33	1,41	1,42	1,42
Maravilla desgrasada	14,1	5,0	0,0	0,0
Harina pluma	22,3	15,6	19,7	18,8
Total ingredientes alternativos	39,7	47,0	54,4	62,0
Relación PB GLE/ PB IA	0,0	0,50	0,60	0,70
Relación PB GLE/ PB total	0,0	0,25	0,33	0,42

PB= proteína bruta; GLE= grano lupino entero; IA= ingredientes alternativos y HP=harina de pescado.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales. Los valores se expresan en g/100 de dieta.

Aminoácidos*	**Dietas experimentales**			
	L-00	**L-30**	**L-40**	**L-50**
Metionina	0,97	1,04	0,99	0,72
Cistina	0,58	0,65	0,67	0,58
Metionina + cistina	1,55	1,69	1,66	1,31
Lisina	2,77	2,49	2,37	2,20
Treonina	1,88	1,92	1,93	1,71
Arginina	2,94	2,77	2,92	3,18
Isoleucina	1,97	2,01	2,08	1,85
Leucina	3,38	4,47	4,72	3,63
Valina	2,51	2,46	2,49	2,15
Histidina	1,28	1,26	1,24	1,09
Fenilalanina	2,04	2,29	2,35	1,96
Glicina	3,06	2,76	2,69	2,43
Serina	2,62	2,72	2,79	2,55
Alanita	2,56	2,98	3,01	2,30
Ácido Aspartico	3,85	3,86	3,94	3,75
Acido Glutámico	6,30	7,34	7,66	6,83

Análisis realizados por el laboratorio analítico de nutrición animal de Degussa.*Valores estandarizados para un contenido de materia seca de 88%.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales. Los valores se expresan g/100g de ácidos grasos detectados.

	Dietas Experimentales			
	L00	**L30**	**L40**	**L50**
% Lípidos totales	23,72 ± 1,64	23,57 ± 1,78	22,40 ± 2,3	20,32 ± 3,0
Ácidos Grasos Saturados				
C12:0 Á. Láurico	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
C14:0 Á. Mirístico	5,19 ± 0,12	5,87 ± 0,08	5,82 ± 0,07	5,43 ± 0,05
C15:0 Á. Pentadecanoico	0,76 ± 0,01	0,81 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,73 ± 0,00
C16:0 Á. Palmítico	19,26 ± 0,27	19,22 ± 0,56	18,64 ± 0,35	17,46 ± 0,03
C17:0 Á. Heptadecanoico	1,26 ± 0,01	1,15 ± 0,09	0,90 ± 0,08	0,82 ± 0,05
C18:0 Á. Esteárico	5,19 ± 0,12	2,68 ± 3,06	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,01
C20:0 Á. Araquídico	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,05	0,14 ± 0,02
C21:0 Á. Henicosanoico	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,86 ± 1,13	0,03 ± 0,00
C22:0 Á. Behénico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C23:0 Á. Tricosanoico	2,21 ± 0,21	1,05 ± 1,15	1,45 ± 0,25	1,53 ± 0,54
C24:0 Á. Lignocérico	0,20 ± 0,12	0,18 ± 0,17	0,15 ± 0,15	0,09 ± 0,03
Total de SAFA	34,43 ± 0,21	31,29 ± 3,30	29,37 ± 0,14	26,81 ± 0,62
Ácidos Grasos Monoinsaturados				
C14:1 Á. Miristoléico	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,00
C15:1 Á. Pentadecenoico	0,20 ± 0,00	0,11 ± 0,14	0,17 ± 0,03	0,09 ± 0,12
C16:1 Á. Palmitoléico	4,70 ± 0,05	5,10 ± 0,01	4,81 ± 0,08	4,66 ± 0,13
C17:1 Á. Heptadecenoico	0,33 ± 0,05	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,34 ± 0,00
C18:1n9t Á. Elaidico	2,34 ± 0,14	3,24 ± 1,76	4,24 ± 0,02	4,07 ± 0,11
C18:1n9c Á. Oléico	20,37 ± 0,38	21,78 ± 0,40	25,02 ± 0,03	28,86 ± 0,01
C20:1n9 Á. Eicosenoico	8,19 ± 0,09	8,34 ± 0,37	7,91 ± 0,08	7,87 ± 0,25
C22:1n9 Á. Erúcico	0,00 ± 0,00	1,17 ± 0,31	0,92 ± 0,00	0,85 ± 0,06
C24:1n9 Á. Nervónico	0,79 ± 0,36	0,39 ± 0,23	0,29 ± 0,09	0,47 ± 0,15
Total de MUFA	37,08 ± 0,50	40,71 ± 2,50	43,93 ± 0,02	47,37 ± 0,70
Ácidos Grasos Poliinsaturados				
C18:2n6t Á. Linolélaidico	0,60 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,79 ± 0,09	0,74 ± 0,01
C18:2n6c Á. Linoléico	4,70 ± 0,02	5,89 ± 0,12	6,08 ± 0,09	5,84 ± 0,05
C18:3n3 Á. Linolénico	0,71 ± 0,01	0,81 ± 0,00	1,30 ± 0,14	2,23 ± 0,26
C18:3n6 Á. g-linolénico	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00
C20:2n6 Á. Eicosadienoico	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,34 ± 0,05
C20:3n3 Á. Eicosatrienoico	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
C20:3n6 Á. Homo-γ-Linolénico	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
C20:4n6 Á. Araquidónico	0,97 ± 0,02	0,51 ± 0,24	0,10 ± 0,00	0,17 ± 0,08
C20:5n3 A. Eicosapentaenoico	9,87 ± 0,13	9,52 ± 0,13	8,68 ± 0,06	8,05 ± 0,03
C22:2n6 Á. Docosadienoico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C22:6n3 Á. Docosahexaenoico	11,03 ± 0,61	10,01 ± 0,16	9,25 ± 0,43	8,25 ± 0,30
Total de PUFA	28,48 ± 0,71	28,00 ± 0,80	26,70 ± 0,16	25,82 ± 0,08
∑n-3	21,75 ± 0,73	20,46 ± 0,04	19,34 ± 0,35	18,64 ± 0,02
∑n-3 HUFAs	6,45 ± 0,01	7,25 ± 0,81	7,06 ± 0,17	6,84 ± 0,11
∑n-6	3,37 ± 0,12	2,84 ± 0,32	2,74 ± 0,12	2,73 ± 0,04
∑n-3/∑n-6	20,91 ± 0,75	19,53 ± 0,04	17,93 ± 0,49	16,30 ± 0,27
C18:1n9[1]/DHA	2,06 ± 0,14	2,50 ± 0,26	3,17 ± 0,14	3,99 ± 0,16

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 6).

[2] Incluidos los ácidos elaidico y oléico.

5.2.2 Estudio de Crecimiento

El bioensayo de crecimiento se llevó a cabo en la estación experimental piscicultura Los Laureles de la Universidad Católica de Temuco (Temuco, Chile). Se utilizaron juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), de un peso promedio inicial de 54,0 ± 6,2g. Antes de distribuir los peces en los estanque de crecimiento fueron mantenidos en un estanque de $2m^3$ y alimentados con la dieta control, luego de un periodo de 10 días fueron pesados, medidos y distribuidos en los estanques de crecimiento. La prueba de crecimiento tuvo una duración de 11 semanas.

Los peces se distribuyeron al azar (49 individuos por estanque) a una densidad promedio de 9,3 kg/m^3, en 12 estanques circulares de fibra de vidrio de 500 litros (descritos en la metodología general de esta tesis). El abastecimiento de agua a cada estanque se realizó por gravedad con una tasa de cambio de 1.5/hora. La temperatura promedio del agua durante todo el periodo de experimentación fue de 14,0 ± 2,7ºC; la temperatura mínima del periodo fue de 10,3ºC mientras que la máxima alcanzó los 18,3ºC. El oxígeno disuelto promedio de 9.9 $\pm$ 0.3 ml/l. Las condiciones de manejo, incluido el sistema de alimentación son descritas en la metodología general de esta tesis.

Antes de comenzar con el experimento de crecimiento se muestrearon al azar 15 peces para los análisis de ácidos grasos, composición corporal e histología. Al finalizar el experimento, se colectaron al azar 5 peces por estanque, los cuales fueron eutanasiados con benzocaina (BZ-20, Laboratorios Veterquimica, Santiago, Chile). Se registró peso del pez completo y peso del hígado. Para muestra de carcasa (pez entero) y muestra de músculo dorsal se trituraron y homogenizaron separadamente, los homogenizados fueron reservados en congelador para posterior análisis.

5.2.3 Estudio de coeficientes de digestibilidad aparente (CDA)

Al final del ensayo de crecimiento se determinó el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas mediante un método de cuantificación indirecto con de Cr_2O_3. En capítulo II, metodología general, se describe detalladamente los estanques y las técnicas utilizada para esta evaluación. Se utilizaron 30 peces por cada estanque de 181,9 ± 3,4g, la alimentación fue saciedad aparente una vez al día. Las heces eran recolectadas diariamente de cada estanque y congeladas para su posterior análisis. La digestibilidad de cada dieta fue evaluada en triplicado.

5.2.4 Mediciones zootécnicas

Después de 77 días de alimentación, en los cuatro tratamientos se evaluó sobrevivencia, crecimiento (SGR, TGC, % ganancia en peso), tasa y eficiencia de conversión (FCR y EF). También se evaluó la eficiencia de la proteína a través de la razón de eficiencia proteica (PER) y el valor productivo de la proteína (VPP). Se evaluó el índice de condición y el índice hepatosomático (HSI). La metodología de muestreo y las ecuaciones utilizadas son descritas en el capítulo II (metodología general).

5.2.5 Análisis químicos

La composición proximal de las dietas, heces y carcasa fueron determinados de acuerdo a los métodos descritos por la AOAC (1998), los resultados fueron en base seca, excepto el análisis de la carcasa que se entrega en base húmeda. El aporte de energía dietario fue estimado asumiendo un contenido energético de 23,6 37,7 y 16,7kJ*g^{-1}, para las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente. Los lípidos totales fueron extraídos desde las muestras de músculo y de alimento mediante el método descrito por Folch et al., (1957). Los esteres metílicos de ácidos grasos fueron separados y cuantificados en un cromatógrafo de gases

Hewlett Packard modelo HP6890 GC System. El perfil de aminoácidos de las dietas fue realizado por Degussa (Alemania). Los detalles de la metodología analítica se muestran en el capítulo II, metodología general.

5.2.6 Análisis histológicos.

Muestras de hígado e intestino fueron fijadas en Bouin alcohólico, deshidratadas en etanol e incluidas en parafina. Secciones de tejido de 4-6µm fueron teñidas utilizando los métodos de hematoxilina y eosina, para luego ser observadas al microscopio óptico binocular.

5.2.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el software Statistica (versión 5.1). La diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos dietarios fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias mediante el test de Tukey.

5.3 RESULTADOS

De acuerdo a Veraguas (2007, com. pers.), la inclusión de altos niveles de inclusión de lupino (sobre un 30%) dificulta el proceso de extrusión. En el presente estudio el proceso de extrusión no se vio afectado por los altos niveles de inclusión de lupino. Lo que tampoco ocurrió en los niveles bajos de inclusión. Las dificultades encontradas por Veraguas la atribuye al nivel de lípidos de la harina descascarada.

5.3.1 Crecimiento y rendimientos productivos.

Durante el periodo de ensayo (11 semanas) todas las dietas fueron aceptadas a satisfacción por los peces, la sobrevivencia de las dietas L0, L30, L40 y L50 fue 97,3; 98,6; 98,0 y 98,0%, respectivamente, no mostrando diferencias significativa entre los tratamientos.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para los diversos índices y parámetros productivos estudiados. El uso del lupino en dietas extruídas, independiente de su nivel de incorporación (30%, 40% y 50%), presenta una performance similar de crecimiento a la obtenida por la dieta control (Dieta L00). El peso medio final para las dietas varió entre los 173,6g (Dieta L50) y 183,2g (Dieta L40), no observándose diferencias significativas entre los tratamientos (P>0.05).

La dieta L40 fue la que presentó el mayor crecimiento expresado como porcentaje de incremento en peso (247,6%), mientras que la dieta L50 fue la presentó el menor incremento (209,3%), aunque no se encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos. En cuanto al consumo diario de alimento, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamiento, sin embargo la dieta L40 fue la que presento numéricamente el valor más alto.

El factor de conversión (FCR) varió entre 1,28 (dieta L00) y 1,38 (dieta L50) sin diferencias estadísticas (P>0,05) entre los tratamientos. La eficiencia del factor de conversión (EF), presentó valores que oscilaron entre 80,2% y el 73,5%, siendo la dieta L50 con la menor eficiencia de conversión.

Al término del experimento la tasa de crecimiento específica (SGR) y el factor de crecimiento termal (TGC) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Para ambos parámetros la dieta L40 fue la que mostró los más altos valores, mientras que la dieta L50 los más bajos.

Tabla 5. Crecimiento y rendimientos productivos de trucha arco iris alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

	Dietas Experimentales			
Parámetro	**L00**	**L30**	**L40**	**L50**
Peso Inicial (g)	54,0 ± 0,0	54,0 ± 0,0	54,0 ± 0,0	54,0 ± 0,0
Peso Final (g)	178,0 ± 5,8	181,9 ± 3,4	183,2 ± 7,1	173,6 ± 4,8
% Incremento en Peso	237,5 ± 5,7	241,9 ± 23,2	247,6 ± 14,9	209,3 ± 15,4
Biomasa Inicial (g)	2733,3 ± 5,7	2800,0 ± 50,0	2733,3 ± 104,1	2783,3 ± 144,3
Biomasa Final (g)	9226,7 ± 208,2	9564,7 ± 479,4	9406,7 ± 250,1	8606,7 ± 555,8
Incremento en Biomasa (g)	6493,3 ± 189,3	6764,7 ± 529,2	6673,3 ± 331,7	5823,3 ± 470,6
Consumo alimento (g/día)	116,8 ± 11,5	119,3 ± 5,9	124,2 ± 8,2	112,6 ± 1,5
FCR	1,28 ± 0,09	1,26 ± 0,12	1,32 ± 0,04	1,38 ± 0,11
FE (%)	80,2 ± 5,7	80,4 ± 6,5	77,1 ± 3,1	73,5 ± 5,5
SGR. (%)	1,71 ± 0,02	1,73 ± 0,10	1,74 ± 0,08	1,59 ± 0,07
TGC	0,185 ± 0,004	0,189 ± 0,002	0,190 ± 0,005	0,180 ± 0,004
PER	1,60 ± 0,11	1,64 ± 0,16	1,57 ± 0,15	1,57 ± 0,12
PPV(%)	32,9 ± 2,2	34,2 ± 3,3	32,1 ± 3,1	32,6 ± 2,4

Los valores son el promedio con una desviación estándar de tres replicas.
Valores con exponentes diferentes dentro de cada fila denotan diferencias significativas (P<0,05).

La razón de eficiencia proteica (PER) varió entre 1,57 (Dieta L40 y L50) y 1,64 (Dieta L30), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (P>0,05). Mientras que con el valor productivo de la proteína (PPV), el valor más bajo se obtuvo con la dieta L40 (32,1%) y el valor más alto con la dieta L30 (34,2%), sin diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

5.3.2 Composición corporal de los peces

La composición corporal e índices hepatosomáticos (HSI) iniciales y finales de los peces utilizados en el presente experimento son mostrados en la Tabla 6. En general, la inclusión de la harina de lupino en la dieta, no afecto en forma significativa la composición proximal de los peces (P>0.05). No obstante, al finalizar la experimentación, todos tratamientos presentan una aumento en el contenido de materia seca y una disminución

en el contenido de lípidos y cenizas (P<0.05), respecto a la composición corporal inicial.

Los HSI presentaron diferencias significativas (P<0,05) entre los peces alimentados con las distintas dietas y con el valor inicial de IHS. Al final del ensayo los valores HSI variaron entre 1,19 (dieta L50) y 1,45 (dieta L30) con diferencias estadísticas significativas entre ellos (P<0,05), sin embargo ambos valores no se diferenciaron estadísticamente del valor inicial del IHS (1,40).

Tabla 6. Composición corporal e índice hepatosomático de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentado con diferentes dietas experimentales.

Composición Proximal (%)	Inicial	Dietas Experimentales			
		L00	L30	L40	L50
Materia seca	22,21 ± 0,02^{b}	25,81 ± 0,78^{a}	25,95 ± 0,32^{a}	26,08 ± 0,16^{a}	25,61 ± 0,26^{a}
Proteína[1]	18,49 ± 0,11^{a}	19,66 ± 0,43^{a}	19,51 ± 0,37^{a}	19,43 ± 0,14^{a}	19,19 ± 0,75^{a}
Lípidos[1]	1,71 ± 0,03^{b}	4,69 ± 0,93^{a}	4,95 ± 0,71^{a}	5,03 ± 0,23^{a}	4,61 ± 0,41^{a}
Cenizas[1]	1,59 ± 0,04^{a}	1,36 ± 0,01^{b}	1,36 ± 0,02^{b}	1,33 ± 0,07^{b}	1,37 ± 0,02^{b}
HSI	1,40 ± 0,16^{ba}	1,27 ± 0,11^{ba}	1,45 ± 0,02^{a}	1,34 ± 0,03^{ba}	1,19 ± 0,07^{b}

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 3 replicas).
^{a,b,c} Valores en una misma fila con distinto superíndice son significativamente diferentes (P<0.05).
[1] Los datos son entregados en base húmeda.

5.3.3 Estudio histológico

En términos generales la histología del intestino medio (Figura 1) y de hígado (Figura 2) de los peces alimentados con las diferentes dietas, no presentaron evidencias claras de cambios entre la histología inicial y final para los distintos tratamientos. Sin embargo, al comparar la morfología celular del epitelio intestinal del intestino medio en los tratamientos L40 y L50 aparece en la mayoría de los peces citoplasma menos basófilos, es decir con escasa tinción, desplazamiento nuclear distal y con abundante gotas lipídicas, aún cuando en algunas muestras no fue observada esta situación. Respecto al tejido hepático, los hepatocitos de los peces iniciales (Figura 2) con la de los peces finales en los tratamientos L00 y L40 presentan similitud en cuanto al desplazamiento de los núcleos a

causa de una moderada infiltración lipídica del citoplasma, curiosamente este hecho fue mucho menos evidente en los tratamientos L30 y L50, siendo esta última claramente más normal que en todo los tratamientos.

5.3.4 Coeficiente de digestibilidad aparente de las dietas

La Tabla 7 presenta los resultados de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas evaluadas. Los valores de CDA obtenidos para materia seca (CDA total) oscilaron entre 82,85% (L50) y 88,97% (L40), la dietas L00, L30 y L40 no presentaron diferencias estadísticas significativa para el CDA total, mientras que la dieta L50 fue significativamente más baja ($P<0,05$) que ellas. El CDA de lípidos y proteínas no presento diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0,05$). El CDA de los carbohidratos más bajo se obtuvo con la dieta L50 (66,60%) aunque sin diferencias significativas con las dietas L00 y L30, mientras que el valor significativamente ($P<0,05$) más alto se obtuvo con la dieta L40 (75,90%) aunque sin diferencias significativas con la dieta L00. El CDA del fósforo (retención) presentó valores significativamente ($P<0,05$) más altos con las dietas L40 y L50 (75,19 y 72,69% respectivamente), sin embargo sin diferencias estadísticas entre ellos. La retención más baja de fósforo se obtuvo con la dieta L30 (66,33%) sin diferencias significativas con la dieta L00. La energía digestible no mostró diferencias significativas entre las dietas.

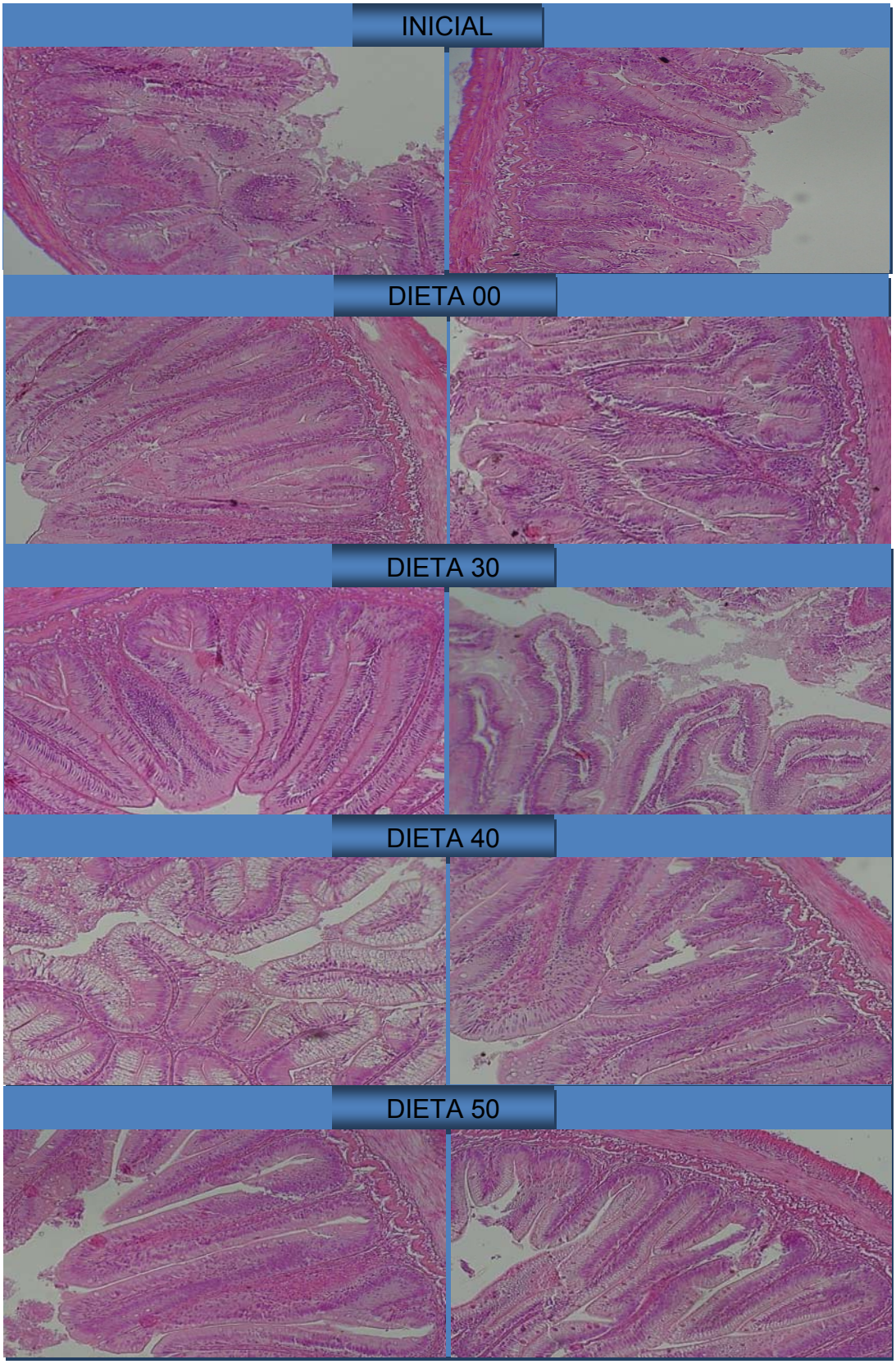


Figura 1. Tejido digestivo de los peces previo y posterior a la aplicación de los tratamientos. Para cada tratamiento se muestra dos microfotografías que corresponden a peces diferentes. Aumento 40X.

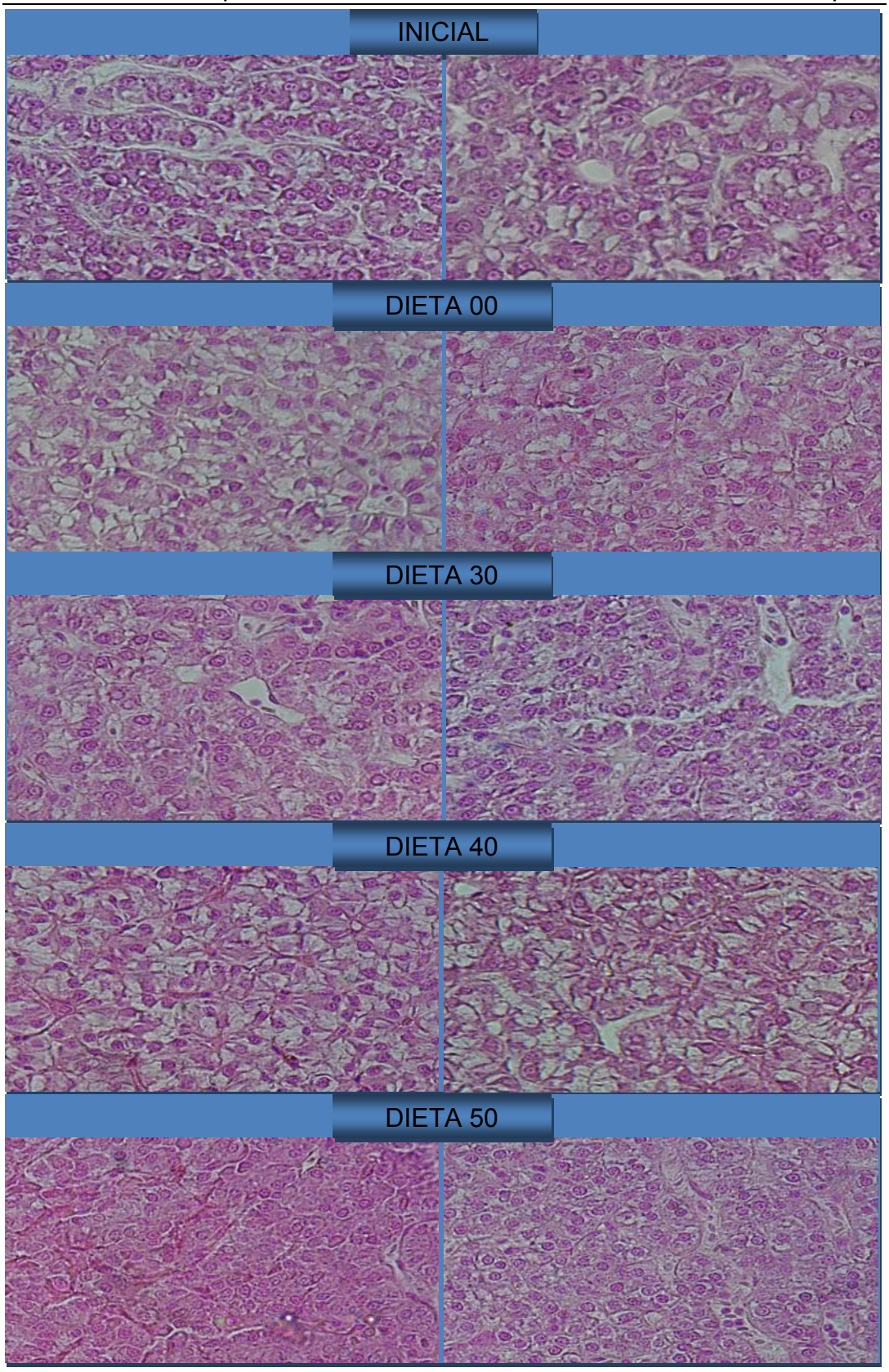


Figura 2. Tejido hepático de los peces previo y posterior a la aplicación de los tratamientos. Para cada tratamiento se muestra dos microfotografías que corresponden a peces diferentes. Aumento 40X.

Tabla 7. Coeficiente de digestibilidad aparente y energía digestible para las dietas experimentales.

	Dietas Experimentales			
	L00	**L30**	**L40**	**L50**
Materia seca	86,24 ± 1,34^{ba}	86,73 ± 0,58^{a}	88,97 ± 0,58^{a}	82,85 ± 2,12^{b}
Proteínas	93,09 ± 0,84	93,58 ± 0,53	94,83 ± 0,54	92,42 ± 1,87 /ns
Lípidos	98,51 ± 0,86	99,06 ± 0,49	98,64 ± 0,72	98,62 ± 0,67 /ns
Carbohidratos	69,70 ± 2,54^{ba}	68,39 ± 0,83^{b}	75,90 ± 0,93^{a}	66,60 ± 4,43^{b}
Fósforo	66,31 ± 3,63^{cb}	62,33 ± 2,30^{c}	75,19 ± 2,19^{a}	72,69 ± 2,05^{ba}
E. D. (Mj/Kg)	22,44 ± 0,24	22,96 ± 0,12	22,99 ± 0,12	21,12 ± 0,39 /ns
PD/ED (g/MJ)	20,11	21,62	21,86	20,66

% Promedio ± Desv. Estándar (n=3), ns: no significativo. ED= energía digestible. PD= proteína digestible

5.3.5 Composición de ácidos grasos en el músculo

El perfil de ácidos grasos de músculo de trucha arco iris; al inicio y al final del ensayo se muestra en la Tabla 8. La incorporación de los diferentes niveles de lupino entero en las dietas, no mostró cambios significativos (P>0,05) de los ácidos grasos saturados totales (*SAFAs*) del músculo. Aun cuando la composición de *SAFAs* inicial del músculo fue numéricamente mayor (37,40%) esta no mostró diferencias significativas con los valores al finales en los distintos tratamientos, variando estos entre 33,10% y 37,32%. Si bien el nivel de *SAFAs* en la dieta muestra una tendencia a disminuir en cuanto aumenta el nivel de lupino en la dieta, esta no se reflejo en la composición del músculo al final del experimento (Figura 3).

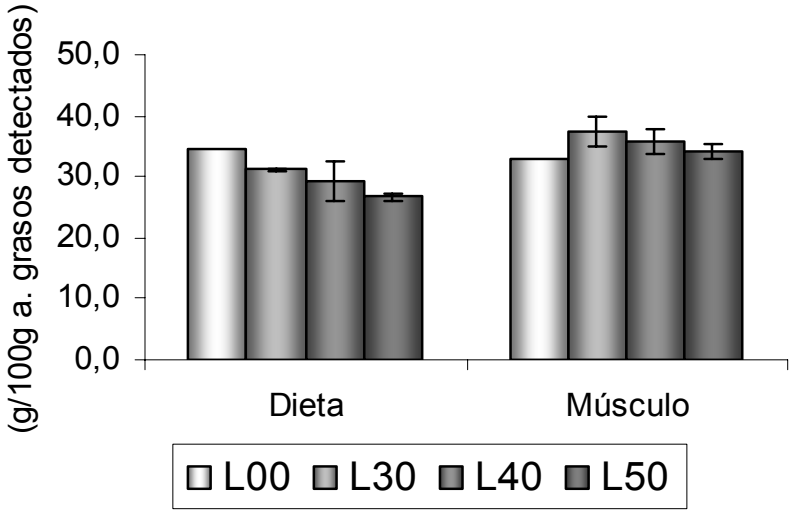


Figura 3. Concentración total de ácidos grasos saturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos presentes en el músculo de trucha arco iris alimentado con las diferentes dietas experimentales. Los valores se expresan en g/100g de ácidos grasos detectados.

	Dietas Experimentales				
	Inicial	**L00**	**L30**	**L40**	**L50**
% Lípidos totales	1,68 ± 0,45^{b}	4,27 ± 0,45^{a}	3,52 ± 1,21b^{a}	3,79 ± 0,62^{a}	3,39 ± 0,66^{ba}
Ácidos Grasos Saturados					
C12:0 Ácido Láurico	0,00 ± 0,00^{b}	0,09 ± 0,01^{a}	0,09 ± 0,04^{a}	0,06 ± 0,06^{a}	0,07 ± 0,01^{a}
C14:0 Ácido Mirístico	3,18 ± 0,07^{a}	3,76 ± 3,04^{a}	5,51 ± 0,71^{a}	5,27 ± 0,05^{a}	5,23 ± 0,52^{a}
C15:0 Ácido Pentadecanoico	0,57 ± 0,01^{b}	0,72 ± 0,02^{a}	0,70 ± 0,09^{a}	0,73 ± 0,01^{a}	0,75 ± 0,04^{a}
C16:0 Ácido Palmítico	25,76 ± 2,46^{a}	21,96 ± 0,70^{a}	24,53 ± 3,87^{a}	22,99 ± 0,38^{a}	21,99 ± 0,65^{a}
C17:0 Ácido Heptadecanoico	0,83 ± 0,04^{a}	0,74 ± 0,28^{a}	0,81 ± 0,18^{a}	0,80 ± 0,01^{a}	0,79 ± 0,01^{a}
C18:0 Ácido Esteárico	4,82 ± 0,01^{a}	4,43 ± 0,11b^{a}	4,55 ± 0,46^{a}	4,43 ± 0,13^{ba}	4,02 ± 0,08^{b}
C20:0 Ácido Araquídico	0,65 ± 0,52^{a}	0,33 ± 0,06^{a}	0,30 ± 0,04^{a}	0,29 ± 0,06^{a}	0,25 ± 0,03^{a}
C21:0 Ácido Henicosanoico	0,45 ± 0,10^{a}	0,40 ± 0,04^{a}	0,39 ± 0,03^{a}	0,36 ± 0,07^{a}	0,40 ± 0,01^{a}
C22:0 Ácido Behénico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C23:0 Ácido Tricosanoico	0,78 ± 0,04^{a}	0,40 ± 0,06^{ba}	0,27 ± 0,03^{b}	0,31 ± 0,13^{b}	0,43 ± 0,33^{ba}
C24:0 Ácido Lignocérico	0,36 ± 0,51^{a}	0,22 ± 0,05^{a}	0,20 ± 0,05^{a}	0,53 ± 0,35^{a}	0,16 ± 0,05^{a}
Total de SAFAs	37,40 ± 1,47^{a}	33,10 ± 2,39^{a}	37,32 ± 2,00^{a}	35,82 ± 0,68^{a}	34,16 ± 1,12^{a}
Ácidos Grasos Monoinsaturados					
C14:1 Ácido Miristoléico	0,07 ± 0,10^{a}	0,11 ± 0,07^{a}	0,10 ± 0,01^{a}	0,12 ± 0,04^{a}	0,20 ± 0,07^{a}
C15:1 Ácido Pentadecenoico	0,00 ± 0,00^{b}	0,17 ± 0,01^{a}	0,18 ± 0,00^{a}	0,16 ± 0,00^{a}	0,16 ± 0,01^{a}
C16:1 Ácido Palmitoléico	4,39 ± 0,39^{b}	6,02 ± 0,24^{a}	5,35 ± 0,48^{a}	5,70 ± 0,29^{a}	5,46 ± 0,33^{a}
C17:1 Ácido Heptadecenoico	0,39 ± 0,03^{b}	1,04 ± 0,06^{a}	1,03 ± 0,19^{a}	0,86 ± 0,25^{a}	0,97 ± 0,03^{a}
C18:1n9t Ácido Elaidico	17,31 ± 1,24^{d}	23,47 ± 0,62^{cb}	21,47 ± 1,71^{c}	24,85 ± 1,00b^{a}	26,34 ± 0,49^{a}
C18:1n9c Ácido Oléico	4,08 ± 0,04^{b}	3,53 ± 0,04^{a}	3,25 ± 0,36^{a}	3,20 ± 0,08^{a}	3,31 ± 0,12^{a}
C18:1n9t+C18:1n9c	21,39 ± 1,29^{c}	27,00 ± 0,64^{ba}	24,72 ± 2,03^{b}	28,05 ± 0,98^{a}	29,65 ± 0,57^{a}
C20:1n9 Ácido Eicosenoico	0,00 ± 0,00^{c}	4,98 ± 0,41^{a}	3,86 ± 0,59^{b}	4,17 ± 0,10^{ba}	3,84 ± 0,12^{b}
C22:1n9 Ácido Erúcico	0,19 ± 0,01^{b}	0,76 ± 0,18^{a}	0,75 ± 0,08^{a}	0,72 ± 0,07^{a}	0,57 ± 0,16^{a}
C24:1n9 Ácido Nervónico	0,23 ± 0,33^{a}	0,56 ± 0,37^{a}	0,37 ± 0,11^{a}	0,55 ± 0,19^{a}	0,46 ± 0,46^{a}
Total de MUFAs	26,66 ± 1,93^{c}	40,64 ± 0,33^{a}	36,35 ± 2,92^{b}	40,34 ± 1,33^{ba}	41,29 ± 0,27^{a}
Ácidos Grasos Poliinsaturados					
C18:2n6t Ácido Linolélaidico	0,24 ± 0,03^{b}	0,47 ± 0,05^{a}	0,47 ± 0,16^{a}	0,38 ± 0,02^{ba}	0,43 ± 0,01^{ba}
C18:2n6c Ácido Linoléico	7,65 ± 0,48^{a}	4,34 ± 0,12^{c}	5,24 ± 0,28^{b}	5,49 ± 0,24^{b}	5,66 ± 0,48^{b}
C18:3n3 Ácido Linolénico	1,08 ± 0,21^{b}	0,67 ± 0,04^{c}	0,66 ± 0,02^{c}	0,95 ± 0,01^{b}	1,56 ± 0,09^{a}
C18:3n6 Ácido g-linolénico	0,00 ± 0,00^{b}	0,09 ± 0,01^{a}	0,08 ± 0,01^{a}	0,08 ± 0,01^{a}	0,08 ± 0,01^{a}
C20:2 Ácido Eicosadienoico	0,00 ± 0,00^{b}	0,37 ± 0,01^{a}	0,36 ± 0,01^{a}	0,34 ± 0,01^{a}	0,37 ± 0,03^{a}
C20:3n3 Ácido Eicosatrienoico	0,19 ± 0,05^{a}	0,17 ± 0,01^{a}	0,17 ± 0,01^{a}	0,16 ± 0,00^{a}	0,16 ± 0,03^{a}
C20:3n6 Ácido Homo-γ-Linolénico	0,99 ± 0,13^{a}	0,11 ± 0,13^{b}	0,06 ± 0,06^{b}	0,26 ± 0,29^{b}	0,10 ± 0,02^{b}
C20:4n6 Ácido Araquidónico	0,23 ± 0,03^{a}	0,10 ± 0,01^{a}	0,27 ± 0,21^{a}	0,09 ± 0,01^{a}	0,39 ± 0,03^{a}
C20:5n3 Ácido Eicosapentaenoico	4,76 ± 0,25^{b}	6,19 ± 0,17^{a}	5,16 ± 0,61^{b}	4,79 ± 0,22^{b}	4,60 ± 0,17^{b}
C22:2 Ácido Docosadienoico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,18	0,00 ± 0,00
C22:6n3 Ácido Docosahexaenoico	20,81 ± 0,72^{a}	13,74 ± 2,09^{b}	11,94 ± 1,97^{b}	11,13 ± 1,19^{b}	11,19 ± 2,04^{b}
Total de PUFAs	35,93 ± 0,46^{a}	26,26 ± 2,45^{b}	24,44 ± 2,35^{b}	23,84 ± 0,72^{b}	24,54 ± 1,38^{b}
∑n-3	26,83 ± 0,82^{a}	20,78 ± 2,30^{b}	17,94 ± 2,54^{b}	17,02 ± 1,19^{b}	17,52 ± 2,07^{b}
∑n-3 HUFAs	25,57 ± 0,97^{a}	19,94 ± 2,26^{c}	17,10 ± 2,54^{cb}	15,91 ± 1,20^{b}	15,80 ± 2,13^{b}
∑n-6	9,10 ± 0,36^{ba}	5,11 ± 0,23^{a}	6,13 ± 0,25^{ba}	6,30 ± 0,52^{b}	6,65 ± 0,73^{b}
∑n-3/∑n-6	2,81 ± 0,22^{a}	4,06 ± 0,35^{b}	2,94 ± 0,51^{b}	2,72 ± 0,39^{b}	2,68 ± 0,61^{b}
C18:1n9*/DHA	1,03 ± 0,01^{b}	1,99 ± 0,30^{a}	2,09 ± 0,20^{a}	2,54 ± 0,31^{a}	2,72 ± 0,55^{a}

Cada valor es el promedio ± su desviación estándar (n = 6).
^{a,b,c,d} Valores en una misma fila con distinto superíndice son significativamente diferentes (P<0.05).
* Suma de los ácidos elaídico y oléico.

En los *SAFAs*, el ácido graso más abundante es el ácido palmítico (C16:0), el que presenta una tendencia a disminuir su contenido en el músculo, conforme aumenta el nivel de lupino dietario, sin embargo, en ningún caso este aumento es significativo (P>0.05).

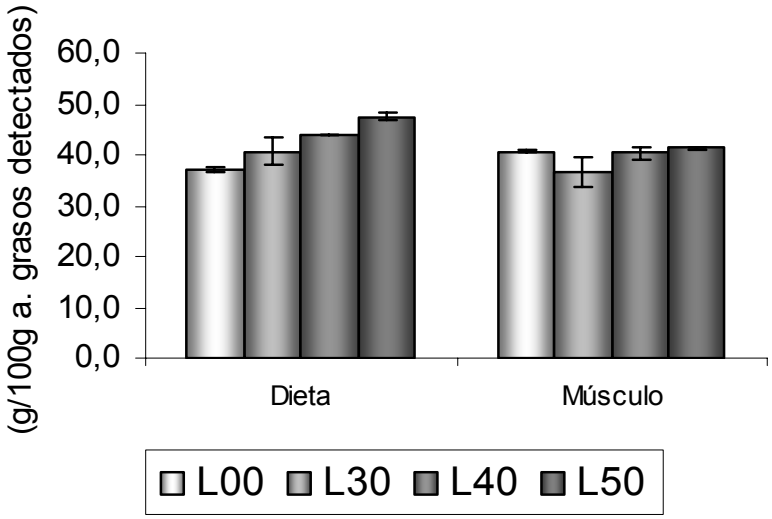


Figura 4. Concentración total de ácidos grasos mono-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

Los ácidos grasos mono-insaturados (*MUFAs*) en el músculo de la trucha arco iris mostraron una tendencia a incrementar conforme aumenta el nivel de incorporación de lupino en las dietas (Figura 4). Las concentraciones de *MUFAs* del músculo mostraron diferencias significativas (P<0,05) entre el nivel inicial y final. Del mismo modo, los MUFAs del músculo al final del ensayo mostraron diferencias significativas (P<0,05) entre los tratamientos. La dieta L30 obtuvo el nivel significativamente más bajo respecto a los tratamientos L00, L40 y L50 (Tabla 8), mientras que estos últimos no mostraron diferencias significativas entre ellos (P>0,05). La variación en la concentración de los *MUFAs* en el músculo se explican por el incremento significativo (P<0,05) de los ácidos palmitoléico (16:1) heptadecenioco (17:1), elaídico (18:1n9t) y oleico (18:1n9c). La suma de la configuración Trans y Cis del ácido oleico varió entre 24,72 (dieta L30) y 29,65 (dieta L50) del porcentaje de área (Figura 6a), las concentraciones

significativamente más altas para estos ácidos grasos se encontraron en el músculo con los tratamientos dietarios L40 y L50.

La concentración total de ácidos grasos poli-insaturados (*PUFAs*) del músculo tiende a disminuir ligeramente conforme aumenta el nivel de incorporación de lupino en la dieta (Figura 5), aunque estas concentraciones no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos (P>0,05). Sin embargo, la concentración inicial del músculo fue significativamente mayor (P<0,05) que la concentración del músculo al final del ensayo (Figura 5 y Tabla 8). La concentración total de ácidos poli-insaturados de la serie n-6 en el músculo presentó diferencias significativas (P<0,05) entre los distintos tratamientos, la dieta L00 fue significativa menor que las D40 y D50, pero similar a la dieta L30 (Tabla 8), estos valores son el producto de la mayor concentración de los ácidos linoléico (18:2n6c) y araquidónico (22:4n6) en el músculo (Figuras 6b y 6c), el primero presentó la concentración más baja en la dieta L00 y significativamente diferente de los otros tratamientos, mientras que el segundo no presento diferencias entre las distintas dietas evaluadas, inclusive no se diferenció estadísticamente del nivel inicial (Tabla 8).

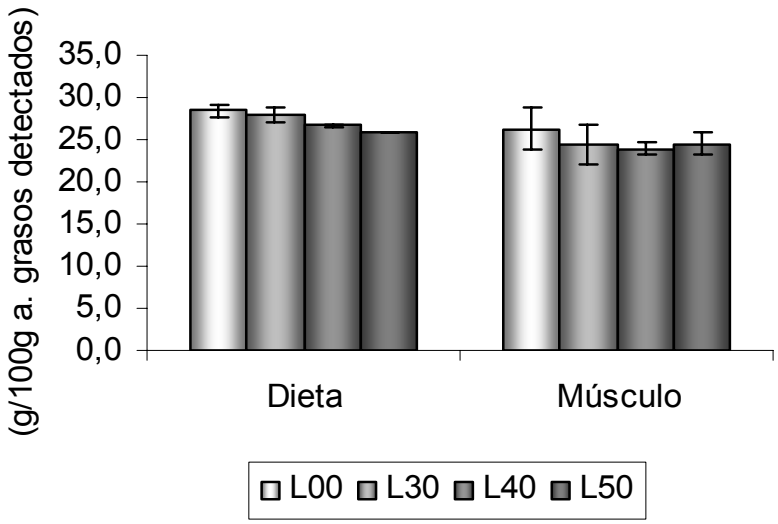


Figura 5. Concentración total de ácidos grasos poli-insaturados en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*.

La concentración total de ácidos poli-insaturados de la serie n-3 en el músculo no mostró diferencias significativas entre los tratamientos dietarios, sin embargo todos ellos tuvieron concentraciones significativamente ($P<0,05$) más bajas que el contenido inicial (Tabla 8).

El ácido linolénico (18:3n3), osciló entre 0,66% (L30) y 1,56% (L50), con diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos y con la concentración inicial del músculo, aunque con niveles más bajos que lo evaluado en las dietas (Figura 6d). La concentración del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3), varió entre 4,60% (L50) y 6,19% (L00), con diferencia significativa ($P<0,05$) entre los tratamientos y con la concentración inicial del músculo (Tabla 8), pero con niveles más bajos que las dietas (Figura 6e).

La concentración del ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n3) en el músculo no mostró diferencia entre todos los tratamientos, la concentración inicial del músculo fue significativamente superior ($P<0,05$) a todos tratamientos. Las concentraciones de DHA en la dieta mostraron una tendencia similar a la concentración en el músculo de los cuatro tratamientos, es decir conforme disminuyó en la dieta respectivamente también los hizo en el músculo (Figura 6f).

El aumento de los *PUFAs* totales del músculo de la serie n6, afecto la relación n3/n6 ($P>0,05$) la cual fue disminuyendo en cuanto aumentaba el nivel de lupino en las dietas. A su vez, la relación 18:1n9/DHA en el músculo, aunque muestra valores significativamente semejantes ($P>0,05$) entre los tratamientos dietarios, estos coeficientes fueron significativamente mayores ($P<0,05$), al ser comparados con el valor inicial del músculo (Tabla 7).

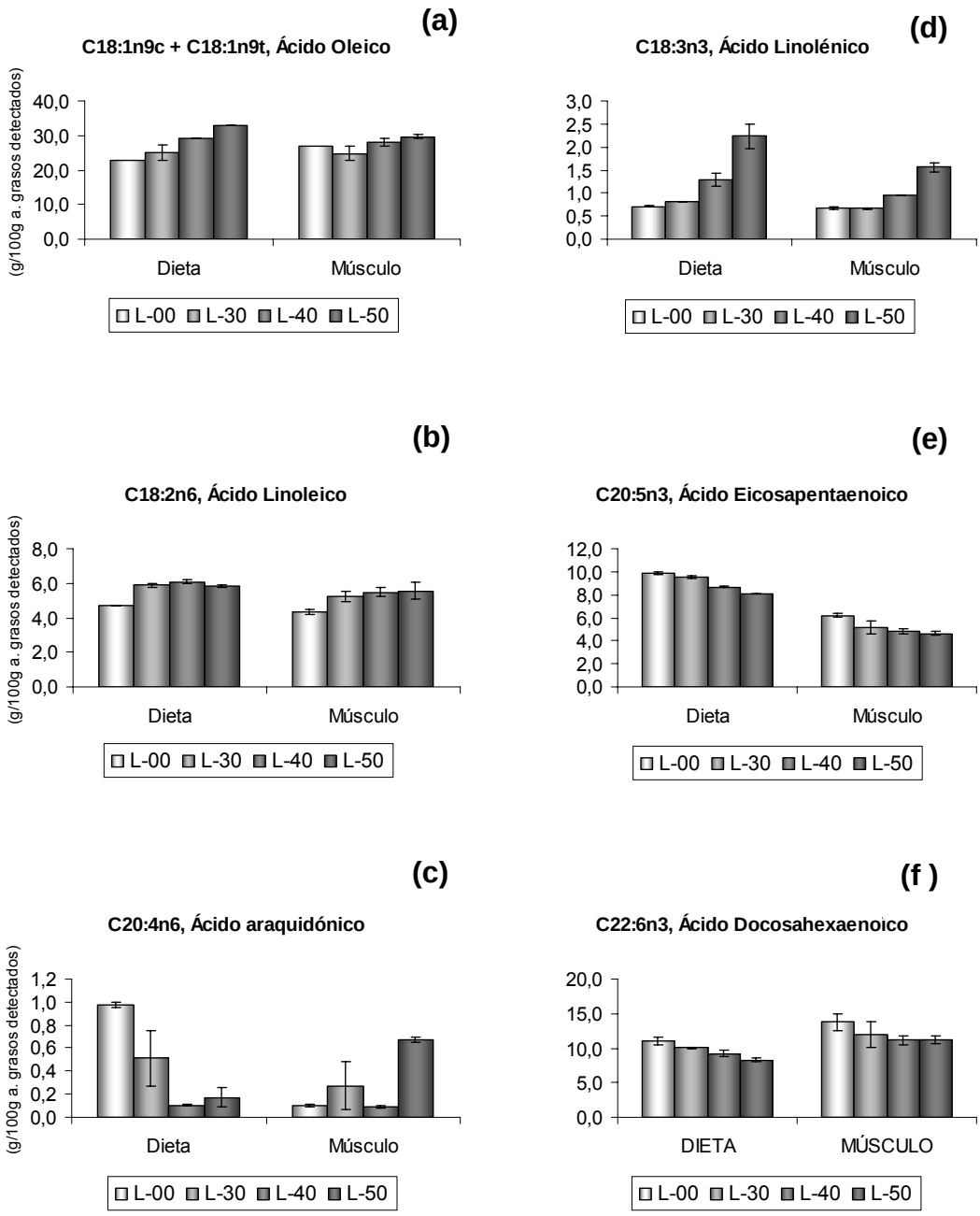


Figura 6. Concentración de algunos ácidos grasos en músculo de trucha arco iris, alimentadas con distintos niveles de *Lupino albus*. La concentración de los ácidos grasos se expresa como g/100g de ácidos grasos detectados.

DISCUSIÓN

Las proteínas alternativas son importantes candidatos para reemplazar la harina de pescado especialmente en dietas de especies carnívoras. Probablemente los vegetales son la alternativa más ampliamente usada en el reemplazo de la harina de pescado, no obstante ellas presentan algunos inconvenientes tales como, no siempre presentan un alto nivel de proteína, poseen baja palatabilidad, son deficientes en algunos aminoácidos y presentan algunos factores anti-nutricionales (Francis et al., 2001). Sin embargo, la semilla de cultivos modernos domesticados de las especies de *Lupinus* contienen insignificantes cantidades de alcaloides, lectinas e inhibidores de tripsina; en términos generales ellas no requieren pre-calentación antes de ser usados como ingredientes en alimentos para especies monogástricas (Petterson, 2000). Seguramente este último hecho, justifica en alguna medida que aun cuando se aumente considerablemente el nivel de incorporación del lupino entero en dietas para truchas los resultados no se diferencian de los obtenidos en el experimento del capítulo IV de esta tesis y son coincidentes con estudios previos (De la Higuera et al., 1988; Hughes, 1991; Morales et al., 1994; Burel et al., 1998; Burel et al. 2000; Carter y Hauler, 2000; Farhangi & Carter, 2001; Glencross, 2001 y 2004).

La principal diferencia del presente estudio con los realizados por los anteriores autores es la incorporación de lupino a partir del grano entero (con cáscara). Las harinas de lupino sin cáscara contiene aproximadamente 39% proteína bruta (42% en base seca), 9,5% grasa cruda y 30% polisacáridos no almidón, ellas tienen una alta energía digestible para cerdos y peces teleósteos y una más alta energía metabolizable para pollos que las harinas con cáscara (Petterson, 2000). Sin embargo, en operaciones comerciales difícilmente se alcanza la separación completa de grano de la cascara, o por una cuestión de operación y costo esta materia prima es usada en forma integral lo que sin

duda reduce el valor nutricional y eventualmente los resultados productivos pudieran verse afectados. Como manera de testear la fabricación de alimentos con lupino bajo condiciones industriales y ver el efecto de ellos en los rendimientos productivos en trucha, en los experimentos del capítulo IV y del presente estudio se utilizó lupino entero en el proceso de fabricación de las dietas. La incorporación de 30, 40 y 50% de lupino entero en dietas para trucha arcoíris, equivalente a un reemplazo de la proteína de la harina de pescado de 25, 33 y 42% por proteína de harina de lupino no afectó el desempeño de los principales parámetros productivos. Este estudio comprueba que el lupino tiene un gran potencial para sustituir la harina de pescado en dietas de salmónidos sin comprometer el desempeño productivo, aún cuando se utilice como grano entero.

En términos generales los crecimientos obtenidos por los peces alimentados con lupino, independientes de su nivel de inclusión, son similares a los conseguidos por la dieta control. Comparable con Moyano et al. (1992) quien mostró que las dietas de trucha de arco iris que contienen 500 o 700 g/kg lupino, los índices crecimiento, la aceptación del alimento y la utilización nutritiva fue similar a una dieta completa de harina de pescado o aún alimento comercial para trucha. El mayor incremento de peso fue alcanzado por los peces alimentados con la dieta con 40% de incorporación de lupino (L40). Del mismo modo, en el consumo de alimento diario no se evidenció diferencia entre las dietas con altos niveles de lupino hiciera suponer la presencia de factores antinutricionales, tal como alcaloides. Las principales sustancias antinutrientes encontradas en la semilla de lupino son varios alcaloides del grupo quinolizidina. Estos compuestos amargos hacen a la semilla impalatable y a veces tóxica (Michael, 2003). La variedad de lupino utilizado en este trabajo (Hamburgo), presento niveles de alcaloides de 0,012%, por lo tanto cae en la denominación de lupino dulce, es decir con niveles de alcaloides menores que 0,05% (Petterson et al. 1997).

La ganancia en peso generalmente decrece al incrementarse el nivel de inclusión de proteínas vegetales debido al inbalance de algunos aminoácidos. Lisina y metionina, por ejemplo, son aminoácidos esenciales requeridos por los peces para sus funciones metabólicas y crecimiento normal (NRC, 1993; Luo et al., 2005), muchas proteínas de planta son deficientes en estos aminoácidos, distintivamente estos son los primeros aminoácidos limitados en las dietas que sustituyen la harina de pescado por altos niveles de proteínas vegetales. El bajo contenido de metionina (0.22 %) y de lisina (1.46 %) es típico de las leguminosas tales como en habas, soya y lupino (Petterson et al. 1997). Las carencias metionina causan reducidos índices de crecimiento, ineficiencia en la conversión y caída en la supervivencia (Goff y Gatlin, 2004). Por esta razón en dietas que contienen altos niveles de proteínas vegetales, la suplementación con metionina y/o lisina es obligatoria a fin de no comprometer los parámetros productivos (Lunger et al. 2007). Los altos niveles de inclusión de lupino en las dietas utilizadas en este experimento no afectaron los rendimientos productivos como crecimiento, conversión y sobrevivencia. De acuerdo a Farhangi & Carter (2001), Burel *et al.* (1998) y Glencross et al. (2004) inclusiones de *Lupinus angustifolius, Lupinus albus y Lupinus luteo* respectivamente, sobre un 40% en dietas suplementadas con aminoácidos, disminuye la ganancia en peso en trucha arco iris. En este estudio, en los tres niveles de inclusión de lupino las dietas fueron suplementadas con metionina y Lisina; si bien numéricamente la ganancia en peso en el nivel de inclusión de 50% fue menor que las restantes dietas, estadísticamente no fue diferente. Coincidente con los anterior, Farhangi & Carter (2001) observaron que la tendencia de la ganancia en peso generalmente decrecía con los altos niveles de inclusión de lupino (*Lupinus angustifolius*) descascarado, pero no encontró diferencias significativas con inclusiones sobre el 40%. La razón de eficiencia proteica (PER) y el valor productivo de la proteína (PPV) no se vio alterado por la inclusión de altos niveles de lupino. Gouveia y Davies (2000) tampoco encontraron cambios en estos parámetros al incorporar hasta un 30% de harina de arveja en dietas para

trucha arcoíris. La sustitución de un 22% de la proteína dietaria con harina de lupino cocida y expandida arrojo valores menores de PER (1,46 y 1,44, respectivamente) y PPV (23,10 y 23,18, respectivamente) (Gouveia, et al, 1991). Al comprar varias dietas con ingredientes vegetales en *Salmo salar*, Carter y Hauler (2000), encontraron PER y PPV menores con sustitución de 33% de *Lupinus angustifolius* (0,78 y 30,23; respectivamente), que los alcanzados con harina de soya y arveja en los mismos niveles de reemplazo (0,98-41,22 y 1,01-45,10; respectivamente). Ellos también encontraron una correlación altamente significativa entre PER y PPV ($r=0,86$; $P<0,001$) desde que el alimento no provoque ningún cambio en la composición química del cuerpo ni en la tasa de consumo de alimento.

La capacidad de la trucha arco iris de adaptarse rápidamente a las dietas con proteínas vegetales (Refstie *et al* 1997), hace que los valores de SGR alcanzados por los peces fueran relativamente altos (1,73 promedio para la dietas L30 y L40), no obstante en la dieta de L50 este valor disminuyó (1,59) aunque sin diferencia estadística con las primeras. Todos estos valores son menores a los reportados por Gouveia *et al.,* (1993) y Morales et al. (1994) al utilizar lupino en la dieta. Sin embargo, Glencross et al. (2004) observó una significativa reducción del crecimiento en trucha arco iris con niveles de incorporación de 50% de harina de *Lupinus luteos* en la dieta.

Los TGC obtenidos en el experimento coincidieron con los valores normales reportados en bibliografía para trucha arco iris, los cuales se fluctúan entre 0.153 y 0.203 (Bureau & Cho; 1999). Sustituciones con lupino no han demostrado efectos significativos sobre el TGC (Glencross et al., 2002). Dietas con altos niveles de lupinos (50% o más) (Burel *et al.* 1998) balanceadas adecuadamente en aminoácidos esenciales igualmente muestran una pequeña caída en el crecimiento, en la eficiencia de conversión y en el consumo diario, efecto numéricamente observado en este estudio. Estas diferencias podrían atribuirse a la presencia de altos

niveles de oligosacáridos, estos compuestos generalmente son α-galactósidos homólogos de la sacarosa. La semilla de lupino entera contiene cantidades significativas de oligómeros de rafinosa, estaquiosa, verbascosa y familias de sacarosa (Petterson, 2000). El nivel de α-galactósidos en lupino puede variar de 70 a 120 g/kg de MS (Trugo y Almeida, 1988). Estos compuestos pueden interferir con la digestión de otros nutrientes, provocar efectos osmóticos en el intestino y causar fermentación anaerobia de los azúcares con incremento en la producción de gas (van Barneveld, 1999). Glencross *et al. (2005)*, encontraron que el nivel de procesamiento de las variedades de lupino y soya tienen una significativa mejora en la mayoría de los parámetros de la digestibilidad, ellos encontraron que los mayores incrementos relativos de la digestibilidad de la materia orgánica, energía y proteína fueron observados entre las harinas sin cáscaras y los concentrados de proteínas. En el presente estudio, el proceso de extrusión de las dietas en el nivel de incorporación de 50% de lupino con cáscara pareciera ser no suficiente para desactivar todos los factores antinutricionales.

La composición proximal de la carcasa de los peces al final del estudio, pareciera no ser afectada por los altos niveles de inclusión de lupino, estos valores son similares a los obtenidos en el experimento con bajos niveles de lupino (capítulo IV), sin embargo en todos los niveles de inclusión, los valores de las proteínas fueron más altos a los encontrados en el experimento de bajos niveles de inclusión (Capítulo IV); mientras que en los lípidos ocurre un efecto contrario, baja concentración de lípidos en altos niveles de inclusión de lupino y alto porcentaje de lípidos en los bajos niveles de inclusión (capítulo IV). Carter & Hauler, (2000) con diferentes niveles de inclusión de concentrado de soya, lupino y arveja no encontró cambios en la composición del cuerpo en *Salmo salar*. Del mismo los resultados de Gouveia et al. (1993) con trucha arco iris; Bórquez and Alarcón (2002) y Bransden et al. (2001) en salmón del atlántico tampoco encontraron cambios en la composición del cuerpo, aún cuando ellos

utilizaron niveles inferiores de inclusión de harina de lupino. Sin embargo Burel et al., (1998) observó una alta deposición de grasas en trucha arco iris con un 50% de incorporación de lupino en la dieta.

Los valores de energía digestible en este estudio fueron estadísticamente similares entre las dietas. La digestibilidad de la energía y de los nutrientes puede ser fuertemente afectada por la naturaleza, composición y tratamiento realizado a una materia prima en particular. Así por ejemplo, la digestibilidad de la materia seca y de la energía para las leguminosas es usualmente mejorada cuando la cáscara y otros componentes carbohidratados son removidos. El lupino descascarado mejora la digestibilidad de todos los nutrientes, pero la extrusión no tiene efecto significativo en la harina de lupino porque no contiene almidón o antinutrientes termolábiles (Allan and Booth, 2004). La relación PD/ED en las dietas evaluadas no mostró diferencias significativas entre ellas (Tabla 7) pero sus valores fueron ligeramente inferiores a lo recomendado (22 a 25 g/MJ) por Cho y Kaushik (1990).

La digestibilidad aparente de las dietas no fue alterada conforme aumentaba el nivel de lupino, del mismo modo los valores de digestibilidad entre las dieta con altos o bajos niveles de incorporación de lupino (capítulo IV) no variaron significativamente entre ellos, ni con la dieta control libre de lupino. Los valores obtenidos son similares a los observados en salmónidos cuando se incorpora diferentes niveles de lupino (Gouveia et al. 1993; Carter et al., 2000; Glencross et al., 2004a; Glencross et al., 2004; Drew et al., 2007). Además, Carter y Hauler (2000) encontraron valores de digestibilidad similares en trucha arco iris con nivel de inclusión de 21 y 31% de concentrado proteico de *Lupinus angustifolius*. A pesar de que la energía digestible (ED) de leguminosas en peces es considerada baja debido a su alto contenido de carbohidratos (Morales et al., 1994); los valores obtenidos en el presente estudio, probablemente justificado por los altos valores de CDA de carbohidratos, son similares a

los reportados por Gomes et al. (1993) en trucha arco iris para dietas con diferentes niveles de incorporación de colza y arvejas. El uso de dietas con altos niveles de leguminosas y cereales ricos en almidón puede tener efectos adversos sobre el hígado de los peces, después de largos periodos de alimentación, debido a un incremento de los depósitos de glicógeno (Russell et al., 2001). Dentro de las leguminosas el lupino posee niveles de almidón y azucares libres insignificantes (14 y 77g/Kg de MS, respectivamente) (van Barneveld, 1999), como respuesta Farhangi & Carter (2001) sugieren una mayor actividad gluconeogénica con el incremento en los niveles de inclusión de lupino. El aumento de la gluconeogénesis, ha sido explicado por la baja digestibilidad de carbohidratos (Brauge et al., 1994), sin embargo los valores de digestibilidad de carbohidratos de las dietas con altos niveles de lupino fueron significativamente altos y comparados a los obtenidos en dietas comerciales para trucha arco iris. Por otro lado los índices hepatosomáticos medidos en este estudio fueron similares entre todos los tratamientos, lo que hace suponer que no hubo acumulaciones significativas de glucógeno o lípidos que hicieran variar este índice.

Lupinus albus sin cáscara puede ser incluida en dietas de trucha de arco iris hasta un nivel de 500 g/kg sin la pérdida en el índice de crecimiento y con significativo aumento en la retención de fósforo (Glencross, 2004). Este mismo efecto fue observado en el presente estudio, las dietas L40 y L50 tuvieron una significativa retención del fósforo respecto a la dieta L30, mecanismo que pareciera independiente de la presencia de la cáscara en la materia prima.

En términos generales la histología del hígado no mostró diferencia entre las dietas con lupino ni con el control, tampoco se observó sobrecarga lipídica significativa en las células hepáticas conforme aumenta el nivel de incorporación de lupino, estas observaciones son coincidentes con Robaina et al. (1995) en *Sparus aurata* con niveles de incorporación de

lupino hasta un 30%, no obstante no se observó pequeños gotas de lípidos ni reducción de los depósitos de glicógeno en el citoplasma. De acuerdo a Rusell et al. (2001) el efecto de la inclusión dietaría de leguminosas se caracteriza por un aumento en los deposito de lípidos y una disminución del glicógeno del citoplasma. La deficiencia en HUFA dietario y una alta densidad de cultivo podrían provocar un aumento en de los depósitos lipídicos del hígado (Montero et al., 2001 y Caballero et al., 2002). Sin embargo, alteraciones de esta naturaleza pueden hacer variar el HSI, como se comentó anteriormente, este índice no mostró aumento significativo respecto al valor inicial, es más, en los peces alimentados con las dietas L40 y L50 disminuyó.

El estudio histológico no reveló cambios morfológicos evidentes de la mucosa intestinal en los peces alimentados con la inclusión creciente de harina de *Lupinus Albus*. Sin embargo, al comparar la morfología celular del epitelio intestinal del intestino medio en los tratamientos L40 y L50 aparece en la mayoría de los peces citoplasma menos basófilos, es decir con escasa tinción, desplazamiento nuclear distal y abundante gotas lipídicas, aún cuando en algunas muestras no fue observada esta situación. No obstante, pudiera ser causada por el nivel de inclusión del lupino. Varios autores han reportado cambios morfológicos de la mucosa intestinal distal de salmónidos cuando se utilizan ingredientes de origen vegetal, estos cambios se traducen en un acortamiento de los pliegues de la mucosa; pérdida de vascuolizacion supranuclear normal de las células absorbentes del epitelio intestinal; ensanchamiento del estroma central dentro de los pliegues de la mucosa, con un aumento del tejido conectivo; y una profunda infiltración de células inflamatorias en la lamina propria (Refstie et al. 2000; Storebakken et al., 2000b). Sin embargo, estos cambios han sido reportados cuando los salmónidos son alimentados con concentrado de proteína de soja producido con extracto de alcohólicos o la presencia de saponinas de corteza de quillazo. Escasa información existe del efecto de otros vegetales sobre la mucosa intestinal, solamente existen

reportes de alteraciones de la mucosa intestinal con *Lupinus angustifolius* y *Lupinus luteos*. Farhangi y Carter (2001) encontraron una mínima tendencia de acortamiento de las vellosidades intestinales proximales de trucha de arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con la inclusión creciente de harina de *Lupinus angustifolius* en la dieta, pero no evaluaron histológicamente otras secciones del intestino. También, Glencross et al. (2004) no encontraron ningún efecto por la incorporación de harina de lupino amarillo (*Lupinus luteus*) sobre la histología del intestino en la trucha de arco iris, aunque el lupino causa un peso gastrointestinal relativo ligeramente más alto que otras materias vegetales. Glencross et al (2006) examinó la influencia del alcaloide gramina, en dietas para la trucha de arco iris, las conclusiones del estudio muestran que por encima de un umbral crítico de 500 g/kg, el alcaloide tiene un fuerte efecto antipalatable. Sin embargo, no encontró pruebas histológicas para definir un efecto tóxico. Por otra parte, Refstie et al. (2006) evaluaron la función digestiva e integridad intestinal en salmón Atlántico (Salmo salar) alimentados harina de grano y concentrados de proteína de *Lupinus luteos* y *Lupinus angustifolius* y observaron lesiones parecidas a una úlcera en el estómago de los peces de todos los grupos evaluados, sin embargo presentan sospechas del nivel de añejamiento de la harina de pescado utilizada.

Estudios de panel de degustación con el salmón Atlántico y la trucha arco iris han establecido que el nivel de lípidos influye enormemente en algunos atributos importantes de calidad de los alimentos, como el sabor y la textura, así como, en la total aceptación del pescado (Katikou et al, 2001). Estos atributos están estrechamente relacionados con la naturaleza, composición y nivel de oxidación de los ácidos de que constituyen esos lípidos. Del mismo modo la distribución de lípidos en el músculo varía ampliamente con la especie, tipo de músculo y parte de músculo de que se trate. Katikou et al. (2001), mostró que el salmón del Atlántico presenta un amplio rango de variación en el contenido de lípidos y humedad en localizaciones específicas del filete. En el presente estudio los análisis de

hicieron a partir del filete total de cada pez, por lo tanto los resultados representan la composición promedio de lípidos y ácido grasos del músculo.

La composición de ácidos grasos en el músculo de trucha arco iris está directamente relacionada al perfil de ácidos grasos en las respectivas dietas. (Bell el al., 2001; Montero et al., 2001; Caballero et al., 2002; Nanton et al, 2007). Las inclusiones de vegetales en las dietas, sobre todo las tortas de oleaginosas, pueden tener un pequeño impacto en la composición del perfil de ácidos grasos del músculo, incluso en altos niveles de inclusión. Los lípidos dentro de las tortas representan una pequeña fracción, generalmente no sobrepasan el 8%. En el presente estudio, en las dietas L30, L40 y L50, el aporte de la harina y aceite de pescado representa 87, 83 y 80% del total de los lípidos de la dieta respectivamente. Los ingredientes alternativos (lupino, maravilla y pluma) aportan sólo 13, 17 y 20 %, respectivamente. Mientras que el lupino con un nivel de 7,4% lípidos en la materia prima aporta las respectivamente a las dietas 10, 14 y 17% del total de lípidos, expresado en porcentaje de la dieta esto es 2,2; 3,0 y 3,7%. A pesar de que la cantidad de lípidos aportada por el lupino pudiera ser algo más significativa que en el experimento con bajos niveles de lupino (Capítulo IV), su elevada proporción de ácidos grasos de la serie *n-6* podría desequilibrar la relación *n-3*/*n-6* (Robaina, 1998). Este coeficiente en el músculo, se ve ligeramente afectado por las dietas, por la abundancia de PUFA de la serie n-3 aportado por el aceite y harina de pescado y en parte compensado por la semilla de lupino, la cual contiene un 9% de ácido linolénico (Masson & Mella, 1985; Petterson et al., 2000). Los resultados obtenidos en este estudio, son coincidentes a los reportados al utilizar otras harinas vegetales, en los que se observa una reducción de la relación *n3*/*n6,* producto de un incremento del 18:2*n6* como también de un decrecimiento en el porcentaje de *n3* PUFA (Gomes et al., 1993).

Al igual que en el experimento con bajos niveles de lupino en la dieta (Capítulo IV) se observa que al incrementar la inclusión de lupino en las dietas, se advierte una ligera disminución en el porcentaje total de SAFA, aunque no estadísticamente significativa. Esto se explica por la reducción del ácido palmítico en las dietas con niveles más altos de lupino, resultado coincidente con Gómes et al. (1993) al usar sustitución creciente de colza en dieta para trucha arco iris.

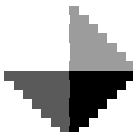
Similarmente a lo observado en el experimento con bajos niveles de lupino (Capítulo IV). Las concentraciones de MUFA en el músculo se incrementan al utilizar lupino en el alimento, esto se explica porque los ingredientes vegetales son ricos en *18:1n9* (Gomes et al., 1993; Guillou el al., 1995; Bell el al., 2001; Caballero el al., 2002). Esta acumulación es consecuencia de la limitada capacidad de desaturar este ácido graso en presencia de altos niveles dietarios de *18:3n3* o *18:2n6* (Storebakken et al., 2000b; Montero et al., 2001). Lo curioso es que en los experimentos con bajos y altos niveles de lupino se repite el mismo el efecto; las dietas presentan una más alta concentración del isómero Cis del 18:1n9 (acido oleico) mientras que en el músculo la situación se revierte y el isómero más abundante del 18:1n9 es el Trans (ácido elaidico).

En general, el reemplazo de harina de pescado con proteínas de origen vegetal (ricas en ácidos graso n6) en dietas para trucha arco iris, tiene como resultado la disminución del nivel de ácidos grasos de cadena larga (eicosapentaenoico, EPA y docosahexaenoico, DHA) y el aumento de los ácidos grasos de 18C (oleico, linoleico, linolénico) en los tejidos de este salmónido (Gomes et al. 1993; de Francesco et al. 2004). Este incremento se debería a una competencia enzimática entre el *18:2n6* y *18:3n3* (Storebakken et al., 2000b), de manera que al existir una alta cantidad de *18:2n6* en la dieta provoca una baja actividad de desaturación para la serie n3 y un aumento de los n6 PUFA totales en el músculo. En el presente estudio, se observa claramente este hecho respecto de la dieta control

L00, embargo los niveles de inclusión en las dietas L30, L40 y L50 no mostraron diferencias entre ellas (Tabla 8). Los niveles de *20:4n6* variaron entre los tratamientos pero sin diferencias significativas, este comportamiento manifiesta una carencia en la conversión del *18:2n6* a *20:4n6*, producto de la competencia entre los PUFA de la serie n3 y n6 por las vías de saturación del hígado (Storebakken et al., 2000b, Bell et al., 2001).

Un indicador de la deficiencia de EFA dietaria usado comúnmente en peces es la relación *18:1n9* /*DHA* (Furuita et al., 1996; Montero et al., 2001). No obstante, aunque los coeficientes fueron estadísticamente similares en todos los tratamientos, incluido el control, los valores fueron superiores a los calculados inicialmente, siendo mayores a 1.0, lo cual en peces marinos, evidencia un déficit en los EFA dietario (Furuita et al., 1996; Montero et al., 2001), resultado de la utilización de insumos vegetales en la fabricación de los alimentos, al elevar los niveles de ácidos eicosatrienoico y oleico (Watanabe, 1982).

Los productos de la industria salmonicultora chilena son de una alta calidad nutricional, caracterizados por la abundancia de HUFA de la serie *n3* y una alta relación *n3*/*n6* PUFA. Es por lo tanto que productores y consumidores desean minimizar cualquier efecto desfavorable, que surge al incluir ingredientes vegetales, en términos de crecimiento y salud de los peces (Bell et al., 2001), además de los efectos benéficos para la salud humana, tales como prevención de enfermedades cardiovasculares (Corraze, 1999). Al utilizar la composición de ácidos grasos, como un indicador de la calidad de la carne para el consumo humano, el uso de la harina de lupino entera hasta un nivel de inclusión de 50%, no alteró de forma significativa su calidad nutricional respecto a la dieta control.



CAPÍTULO VI:

Conclusiones generales

6. CONCLUSIONES GENERALES

1. La trucha arco iris y el salmón poseen un sistema digestivo muy similar, sin embargo la utilización digestiva del lupino es diferente independiente del tratamiento aplicada a este.

2. Pareciera ser que el salmón del Atlántico es mucho más rústico o menos sensitivo a la naturaleza del lupino cuando se evalúa su digestibilidad como ingrediente, sin embargo cuando se evalúa la digestibilidad de la dieta con inclusión del lupino independiente del tratamiento aplicado, aparece la trucha arco iris con una mayor capacidad en la utilización digestiva de la dieta.

3. El calor húmedo y la micronización aplicada a la harina de lupino provocaron resultados diferentes en la digestibilidad aparente de las dietas en la trucha arco iris y el salmón del Atlántico, esto indirectamente explica que los tratamientos indujeron cambios en la materia prima que no son evidenciados por los análisis proximales.

4. La inclusión de bajos y altos niveles de lupino blanco en la dieta no mostró cambios significativos en índices productivos de la trucha arco iris. El SGR, FCR, el consumo de alimento diario y la sobrevivencia no presentaron cambios significativos respecto de las dietas sin inclusión de lupino.

5. La inclusión de la harina de lupino en bajos niveles, no afectó en forma significativa la composición proximal de los peces. Sin embargo, en la inclusión de altos niveles de lupino, todos tratamientos presentan un aumento en el contenido de materia seca y una disminución en el contenido de lípidos y cenizas, respecto a la composición corporal inicial.

6. Al comparar la estructura de los hepatocitos de los peces iniciales con la de los peces al final del ensayo se puede observar que en todos los tratamientos se presentan lesiones por la infiltración grasa de los hepatocitos. Aunque leves esta fue mucho más evidente en las dietas con bajos niveles de lípidos.

7. En términos generales, la histología del intestino medio de los peces alimentados con las dietas con altos niveles de lupino no presentó evidencias claras de cambios entre la histología inicial y final para los distintos tratamientos.

8. Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas evaluadas con bajos y altos niveles de lupino no mostraron diferencias significativas entre ellas ni con la dieta control sin lupino.

9. La incorporación de los diferentes niveles de lupino entero en las dietas, no mostró cambios significativos de los ácidos grasos saturados totales (*SAFAs*) del músculo. Si bien el nivel de *SAFAs* en la dieta muestra una tendencia a disminuir en cuanto aumenta el nivel de lupino en la dieta, ésta no se reflejó en la composición del músculo al final del experimento,

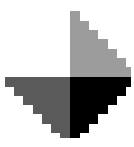
10. Los ácidos grasos mono-insaturados (*MUFAs*) en el músculo de la trucha arco iris mostraron una tendencia a incrementar conforme aumenta el nivel de incorporación de lupino en las dietas.

11. Niveles crecientes de incorporación de lupino en las dietas tienden a disminuir la concentración total de ácidos grasos poli-insaturados (*PUFAs*) del músculo, aunque estas concentraciones no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos. La concentración total de ácidos poli-insaturados de la serie n-6 en el músculo presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos; la dieta L00 fue siempre significativa menor.

12. Al utilizar la composición de ácidos grasos, como un indicador de la calidad del filete para el consumo humano, el uso de la harina de lupino entera hasta un nivel de inclusión de 50%, no alteró de forma significativa su calidad nutricional.

13. Finalmente, la inclusión de lupino entero no provoca problemas en el proceso de extrusión de las dietas ni alteraciones nutricionales o de calidad de producto final.

14. Los resultados de esta tesis avalan que la harina de lupino blanco es un excelente ingrediente para el reemplazo parcial de la harina de pescado. Sin embargo, el balanceo de aminoácidos esenciales, especialmente metionina y lisina, debe ser cuidado en inclusiones hasta 50%.



CAPÍTULO VII:
Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdel-Warith, A., Russell, P., and Davies, S, 2001. Inclusion of a commercial poultry by product meal as a protein replacement of fish meal in practical diets for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research, 32:296-305.

2. Adelizi, P. D., Rosati, R. R., Warner, K., Wu, Y. V., Muench, T. R., White, M. R., Brown, P. B, 1998. Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Nutrition, 4: 255-262.

3. Allan, G. L. 1997. Potencial for pulses in aquaculture systems. NSW fisheries. Australia. 7 pp.

4. Allan, G.L., Rowland, S.J., Mifsud, C., Glendenning, D., Stone, D.A.J., Ford, A, 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: V. Least-cost formulation of practical diets. Aquaculture, 186: 327–340.

5. Allan, G.L., Booth, M.A., 2004. Effects of extrusion processing on digestibility of peas, lupins, canola meal and soybean meal in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) diets. Aquaculture Research, 35: 981-991.

6. AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. Vol. I. Agriculture Chemicals; Contaminants, Drugs, 16th edn. AOAC International, Arlington, VA.

7. Arndt, R. E., Hardy, R. W., Sugiera S. H. and Dong F. M., 1999. Effects of heat treatment and substitution level on palatability and nutritional value of soy defatted flour in feeds for Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture, 180:129-145.

8. Baker, R.T. M., 2001. Canthaxanthin in aquafeed applications: is there any risk?. Trends in Food Science & Technology, 12: 240-243.

9. Bangoula, D., Parent, J.P., Vellas, F., 1993. Nutritive value of white Lupin (*Lupinus albus* v*ar Lutop)* fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*. Effects of extrusion cooking. Reprod. Nutr. Dev., 33: 325–334.

10. Bell, M., Henderson, R. and Sargent, J., 1986. The Role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 83B (4): 711-719 pp.

11. Bell, J.G., McEvoy, J.,Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J. and Sargent, J.R., 2001. Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in

Diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar)* Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid Metabolism. J. Nutr., 131: 1535-1543.

12. Berg, T., 2000. Lípidos en el alimento para salmones. En Profundidad., 10 (2):131-133.

13. Biomar, 2004. Manual de alimentos para peces. Biomar Chile S. A., 106 pp.

14. Bjerkeng**,** B., Refstie, S., Fjalestad, K. T., Storebakken, T., Rødbotten, M. and Roem A. J., 1997. Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. Aquaculture, 157: 297-30.

15. Blanco, C. 1995. La Trucha Cría Industrial. Editorial Mundi-Prensa España. 503pp.

16. Booth, M. A., Allan, G. L., Frances, J, and Parkinson, S., 2001. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*. IV. Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. Aquaculture, 196: 67-85

17. Bórquez A, Valdebenito I, Dantagnan H.P, Barile, J., 1996. Producción y alimentación de Salmónidos cultivados en América Latina y el Caribe. FAO, Circular de pesca Nº 918, Roma. 88pp.

18. Bórquez, A. y Alarcón, P. 2002. Reemplazo parcial de la harina de pescado por lupino blanco (*Lupinus albus*) en dietas para salmón del atlántico (*Salmo salar*). Salmonicultura, 28 (4): 17-19.

19. Bórquez, A., Valdebenito, I., Dantagnan, P. y Barile, J., 1999. Rendimientos productivos de dietas extruidas y pelletizadas en cultivo intensivo de truchas arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. UNAP. Invest. Cient. Tecnol., Ser. Cienc. Mar 4: 50-55.

20. Bransden, M., Carter, C. and Nowak, B., 2001. Effects of dietary protein source on growth, immune function, blood chemistry and disease resistance of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Animal Science 73: 105-113.

21. Brauge C., Medale F. y Corraze G., 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. Aquaculture 123: 109 -120.

22. Bureau, D.P. y C.Y. Cho., 2005. Nutrition and feeding of fish. OMNR Fish Culture Course, University of Guelph, Guelph, Canada. http://www.uoguelph.ca/fishnutrition.

23. Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout. Aquaculture, 180: 345–358

24. Bureau, D.P., Harris, A.M., Bevan, D.J., Simmons, L.A., Azevedo, P.A., Cho, C.Y., 2000. Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets. Aquaculture, 181: 281–291.

25. Burel, C., Boujard, T., Corraze, G., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Mol, K.A., Van der Geyten, S., Kuhn, E.R., 1998. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. Aquaculture, 163: 325-345

26. Burel, C, Boujard, T., Tulli, F, Kaushik, S.J., 2000a. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 188: 285-298

27. Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K.A., Kuhn, E.R., Quinsac, A., Krouti, M. and Ribaillier, D., 2000b. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. Aquaculture, 188: 363-382.

28. Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. and Izquierdo, M.S., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 214: 253-271.

29. Carter, C. and Farhangi, M., 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) to different dietary inclusión levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). Aquaculture research (32) : 329-340.

30. Carter, C. and Hauler, R., 2000. Fish meal replacement by plant meals in extrued feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture, 185:299-311.

31. Cheng, Z. and Hardy, R.. 2002. Apparent digestibility coefficients of nutrients and nutritional value of poultry by-product meals for Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* measured in vivo using settlement. Journal of the world aquaculture society, 33: 459:465.

32. Cho, C. Y. and Kaushik, S. J., 1990. Nutritional energetic in fish: protein and energy utilization in rainbow trout. In: G. H. Bourne (editor), Aspects of Food Production, Comsumption and Energy Value. World Rev. Anim. Nutr., 61: 132-172.

33. Corraze, G., 1999. Nutrition lipidique. In: Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Metailler, R. ed., pp. 147-169. Editions INRA-IFREMER. France.

34. Cubillos, L.A., Bucarey, D.A., Canales, M., 2002. Monthly abundance estimation for common sardine *Strangomera bentinki* and anchovy Engraulis ringens in the central-southern area off Chile (30-40^{o}S). Fisheries research, 57: 117-130.

35. Davis, D.A, Arnold, C.R, McCallum, I., 2000. Nutritional value of field peas *Pisum sativum* in practical diet fromulations for *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture: Book of Abstracts. 165 p.

36. De Francesco, M., Giuliana Parisi, Francoise Médale, Paola Lupi, Sadasivam Kaushik, and Bianca Poli., 2004. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 236: 413–429.

37. De la Higuera, M. & Cardente, G., 1993. La proteína en la nutrición de los peces. En: Castello, F. (ed). En: Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción: pp 195-225. Editorial Universitat de Barcelona. España.

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

39. Delgado C., Rosegrant M., Wada N., Meijer S., and Ahmed M., 2002. Fish as food: diets for rainbow trout increases phosphorus availability. Aquaculture Nutrition, 5: 101-105.

40. Delgado, C. L., Nikolas Wada, Mark W. Rosegrant, Siet Meijer, and Mahfuzuddin Ahmed., 2003. Fish to 2020: Supply and Demand in Changing Global Markets. Jointly published by the International Food Policy Research Institute (IFPRI) and WorldFish Center. 226 pp.

41. Den Bieman, H., 2000. Los desafíos de la industria de alimento para peces. Aquanoticias Internacional, 12 (53): 59-60.

42. DFWA., 2001. Feeding Lupins to Fish: A review of the nutricional and biological value of lupins in aquaculture feeds. W. Australia. 117pp. (http://www.wa.gov.au/westfish/res/broc/report/lupin/summary.html).

43. DIG., 2001. Informe final: Diagnostico sector leguminosas de grano-lupino y taller estratégico del sector. Desarrollo, innovación y gestión en agronegocios. Chile.108 pp.

44. Drew, M.D., T.L. Borgeson and D.L. Thiessen., 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. Animal Feed Science and Technology, 138: 118–136.

45. El-Sayed, A., 1999. Alternative dietary protein source for farmed tilapia, *Oreochromis spp*. Aquaculture, 179: 149-168.

46. Farhangi, M. and Carter, C.G., 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*) Aquacult. Research, 32: 329-340.

47. Fellows, Peter., 2007. Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas. Acribia. Zaragoza. 750 pp.

48. Fernández J., 1993. Los lípidos en la nutricion de los peces. En: Castello, F. (ed). Acuicultura Marina: fundamentos biologicos y tecnología de la producción: 245-252. Editorial Universitat de Barcelona. España.

49. Folch, J., Less, H. and Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol.Chem., 726: 497-509.

50. Fontainhas-Fernandez, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. Aquaculture Internacional, 7.

51. Francis, G., Harinder P.S., Becker, M.K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, 199: 197–227.

52. Furuita, H., Takeuchi, T., Watanabe, T., Fujimoto, H., Sekiya, S. and Imaizumi, K., 1996. Requirements of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and n-3 highly unsaturated fatty acid. Fisheries Science, 62 (3): 372-379.

53. Glencross, B., 2001. Feeding Lupins to Fish: A review of the nutricional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Ed. The Departament of Fisheries, Government of Western Australia. 117 pp.

54. Glengross, B., 2002. Realising the potential of lupin protein meals. Asian Aquaculture Magazine. Nov/Dec. pp 25-27.

55. Glencross, B. D., 2004. Lupins. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond,* Research Division, Department of Fisheries, North Beach, Australia. Volume 1(2): 15 pp

56. Glengross, B., Curnow J., Hawkins, W and Felsing, M., 2002. Evaluation of yellow lupin, *Lupinus lateus,* meal as an alternative protein resource in diets for sea cage reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society, 33 (3): 287-296.

57. Glencross, B, Curnow, J, Hawkins, W, Kissil, GW, Peterson, D., 2003a. Evaluation of the feed value of a transgenic strain of the narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) in the diet of the marine fish, *Pagrus auratus*. Aquaculture Nutrition, 9: 197-206.

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

59. Glencross, B and Hawkins, W., 2004. A comparison of the digestibility of lupin (Lupinus sp.) kernel meals as dietary protein resources when fed to either, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* or red seabream, Pagrus auratus. Aquaculture Nutrition, 10: 65-73.

60. Glencross, B, Evans, D, Hawkins, W, Jones, B., 2004. Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 235: 411-422.

61. Glencross, B.D., Carter C.G., Duijster, N., Evans, D.R., Dods, K., McCafferty, P., Hawkins, W.E., Maas, R., Sipsas, S., 2004a. A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 237: 333–346.

62. Glencross, B., Evans, Dods, McCafferty, Hawkins, Maas, Sipsas., 2005. Evaluation of the digestible value of lupin and soybean protein concentrates and isolates when fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using either stripping or settlement faecal collection methods. Aquaculture, 245: 211 – 220.

63. Glencross, B., Evans, Rutherford, Hawkins, McCafferty, Dods, Jones, Harris, Morton, Sweetingham, Sipsas, 2006. The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. Aquaculture, 253: 512– 522.

64. Glencross, B.D., Booth, M. A., Allan, G. L., 2007. A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. Aquaculture Nutrition, 13: 17–34.

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

66. Gomes, E.F., Corraze, G., Kaushik, S.J., 1993. Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein rapeseed and peas on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 113: 339–353.

67. Gomes, E.F., Rema, P., Kaushik, S.J. 1995**.** Replacement of fishmeal by plant proteins in the diet of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: digestibility and growth performance. Aquaculture, 130, 177-186.

68. Gouveia, A. and S. J. Davies. 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 182: 183–193.

69. Gouveia, A., Olivia Teles, A., Gomes, E. and Rema, P., 1993. Effect of cooking/expansion of three legume seeds on growth and food utilization by rainbow trout. In: Kanshik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice. INRA, Paris, pp. 933-938.

70. Guillaume, J. and Metailler, R. 1999. Mateares premieres et additifs utilisés dans l´alimentation des poissons. En: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. et Metailler, R. (eds). Nutrition et alimentation des poissons et crustacés: 147-169. Editions INRA-IFREMER. France.

71. Guillou, A., Soucy, P., Khalil, M., Adambounou, L., 1995. Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture, 136: 351-362.

72. Hamre, K., Christiansen, R., Waagbø, R., Maage, A., Torstensen, B.E., Lygren, B., Lie, Ø., Albrektsen, S. 2004. Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): Effects on growth performance and fillet quality. Aquaculture Nutrition, 10 (2): 113-123.

73. Hardy, R. 1988. Diet Preparation. In: Halver, J. (ed). Fish Nutricion. Second Edition. pp 476-549. Academic Press, Inc. USA.

74. Hardy, R. W. 1994. Recent advances in aquaculture IV. Aquaculture, 123:173-174.

75. Hardy, R. W. 2006. Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suarez y otros. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. pp. 410-419.

76. Hasan, M. R. 2001. Nutrition and feeding for sustainable aquaculture development in the third millennium. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.R. Arthur, eds. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 193-219. NACA, Bangkok and FAO, Rome.

77. Henderson, R. 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Anim. Nutr.* 49: 5-22.

78. Hua, K and Bureau. D. P. 2006. Modelling digestible phosphorus content of salmonid fish feeds Aquaculture, 254: 455-465

79. Hughes, S.G., 1988. Assessment of lupin flour as a diet ingredient for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 71: 379-385.

80. Hughes, SG. 1991. Use of lupin flour as a replacement for full-fat soy in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 93: 57-62.

81. IFFO. 2006. International Fishmeal and Fish Oil Organisation. Fishmeal and Oil–Supplies and Markets. (http://www.iffo.net)

82. Jahan, P; Watanabe, T; Satoh, S; Kiron, V. 2001. Formulation of low phosphorus loading diets for carp (Cyprinus carpio L.). Aquaculture Research, 32 (s1): 361-368.

83. Katikou P., S.I. Hughes, D.H.F. Robb., 2001. Lipid distribution within Atlantic salmon *Salmo salar* fillets. Aquaculture, 202: 89–99.

84. Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., Fauconneau, B. and. Laroche M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 133: 257-274.

85. Kissil, G.WM., Lupatsch, I., Higgs, D. A., Ardí, R. W., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquaculture Research, 31: 595-601.

86. Koumoundouros, G., Sfakianakis, D., Divanach, P., and Kentouri, M., National Cent. for Marine Research, Athens (Greece). (2003). Morpho-anatomical deformities of fish: Quality control, certification and improvement. 7th Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries. Chersonissos, Greece, 6-9 May 2003. Abstracts. p. 353.

87. Krogdahl, S., Anne Sundby, Jan J. Olli. 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. Aquaculture, 229: 335-360

88. Lall, S.P., 1991. Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. Eds., Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, University of Guelph, Ontario, Canada, pp. 21–36.

89. Lee, K., Dabrowski, K., Blom, J., Bai, S., and Stromberg, P. 2002. A mixture of cottonseed meal, soybean meal and animal byproduct mixture as a fish meal substitute: growth and tissue gossypol enantiomer in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 86 (13p).

90. Lee S. M., Im Gi Jeon, Jong Yun Lee. 2002a. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture, 207 (2002) 79–95.

91. López-Bote, C.J., Diez, A., Corraze, G., Arzel, J., Alvarez, M., Dias, J., Kaushik, S.J., Bautista, J.M. 2001. Dietary protein source affects the susceptibility to lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle. Animal Science 73 (3): 443-449.

92. Lunger, Angela N., E. McLean, T.G. Gaylord, D. Kuhn and S.R. Craig. 2007. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia *Rachycentron canadum*). Aquaculture, 271: 401–410.

93. Luo, Z., Liu, Y., Mai, K., Tian, L., Yang, H., Tan, X., Liu, D., 2005. Dietary L-methionine requirement of juvenile grouper Epinephelus coioides at a constant dietary cystine level. Aquaculture, 249, 409-418.

94. Masson, L., Mella, M. 1985. Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile. Editorial Universitaria. Chile. 31pp.

95. Mendoza, De Dios, Vazquez, Cruz, Ricque, Aguilera, Montemayor. 2001. Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). Aquaculture Nutrition, 7(3): 143-151.

96. Michael, J. P. (2003). Indolizidine and quinolizidine alkaloids. Natural Product Reports, 20(5), 458–475.

97. Mitrano, Victor. 2007. Estabilidad para la harina y aceite de pescado. Aqua 19 (113): 38-43.

98. Montero, D., Robaina, L.E., Socorro, J., Vergara, J.M., Mort, L. and Izquierdo, M.S., 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. Fish Physiol. Biochem, 24: 63-72.

99. Morales, A.E., Cardenete, G., De la Higuera, M., Sanz, A.,1994. Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 124: 117-126.

100. Morrison, W.R. and Smith, L., 1964. Separation of fatty acid methyl esters an dimethyl-acetols from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid. Res., 5: 600-608.

101. Moyano M. J. Cardenete, G. and De la Higuera, M. 1992. Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable proteins for trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Living Resources 5 (1992) 23-29.

102. Mundheim, Harald, Anders Aksnes, Britt Hope. 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. Aquaculture, 237: 315–33.

103. Mwachireya, S. A., Beames, R. M., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S.1999. Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in freshwater, Aquaculture Nutrition, 5 (2): 73-82.

104. Nanton, D. A., Anne Vegusdal, Anna Maria Bencze Rørå, Bente Ruyter, Grete Baeverfjord, Bente E. Torstensen. 2007. Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fish oil and vegetable oil. Aquaculture, 265: 230–243.

105. National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, D.C., USA. 124pp.

106. Oberle, M., Schwarz, F. y Kirchgessner, M. 1997. Growth and carcass quality of carp (*Cyprinus carpio L.*) fed different cereals, lupin seed or zooplankton. Arch tierernahr, 50 (1): 75-86.

107. ODEPA, 2006. Oficina de estudios y políticas agrarias, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. www.odepa.cl.

108. Opstvedt, J., Aksnes, A., Hope, B., Pike, IH. 2003. Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. Aquaculture, 221(1-4):365-379.

109. Peñaloza, E. 1997. El lupino para grano. En: Yankovic, B. (ed). Anuario del Campo: Alternativas para la Modernización y Diversificación Agrícola: 213-220. Publicaciones Lo Castillo S.A. Chile.

110. Pereira and Oliva-Teles. 2004. Evaluation of micronized lupin seed meal as an alternative protein source in diets for gilthead sea bream Sparus aurata L. Juveniles. Aquaculture Research, 35 (2004) 828-835.

111. Petterson, D., Sipsa, S. and Mackintosh, J. 1997. The chemical composition and nutritive value of Australian pulses. Grains research and development corporation, Canberra, Australia. 65 pp.

112. Petterson, D.S., 2000. The use of lupin in feeding system. Review: Asian Austral. J. Anim. Sci., 13, 861-882.

113. Pyke, I. y Zaldivar, F. 2002. Requerimientos futuros: Harinas y Aceites de Pescado para Salmónidos. Revista Chile Acuícola, pp 27-31.

114. Rasmussen, R. S. 2001. Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics. Aquaculture Research, 32 (10): 767-786

115. Refstie, S. B., Glencross, T., Landsverk, M., Sørensen, E., Lilleeng, W. Hawkins, Å., Krogdahl. 2006. Digestive function and intestinal integrity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed kernel meals and protein concentrates made from yellow or narrow-leafed lupins. Aquaculture, 261:1382–1395.

116. Refstie, S., Korsøen, Øyvind 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: 49–63.

117. Refstie, S., Storebakken, T., Baeverfjord, G. & Roem, A.J. 2001. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. Aquaculture, 193(1-2):91-106.

118. Refstie, S., Sahlström, S., Bråthen, E., Baeverfjord, G., Krogedal, P., 2005. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 246:331–345.

119. Refstie, S., Storebakken, T., Roem, A.J., 1998. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon *Salmo salar*. fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. Aquaculture,162, 301–312.

120. Refstie, Stale. 2000. Evaluating Soybean Meal as a Fish Meal Substitute in Feeds for Atlantic Salmon and Rainbow Trout. Doctor Scientiarum Theses. Agricultural University of Norway. I86 pp.

121. Regost, C., Arzel, J. y Kaushik, S. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 180: 99-117.

122. Riche, M. y Brown, P. 1999. Incorporation of plant protein feedstuffs into fish meal diets for rainbow trout increases phosphorus availability. Aquaculture Nutrition, 5 (2): 101-105.

123. Robaina, L. 1998. Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*) Informes Técnicos. Instituto Canario de Ciencias Marinas. 195 pp.

124. Robaina, L., Izquierdo, MS., Moyano, FJ., Socorro, J., Vergara, JM., Montero, D., Fernandez-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.

125. Roberts, R. y Shepherd, C. 1980. Enfermedades de la Trucha y del Salmón. Ed. Acribia. España.187 pp.

126. Russell, P., Davies, S., Gouveia, A. & Tekinay, A. (2001) Influence of dietary starch source on liver morphology in juvenile cultured European sea bass (*Dicentrarchus Labrax L.*). Aquacult. Res., 32, 306-314.

127. Sales, J. & Britz, P.J. 2003. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for South African abalone (Haliotis midae L. Aquaculture Nutrition, 9: 55- 64.

128. SalmonChile, 2007. Asociación de la Industria del Salmón A. G. Chile. www.salmónchile.cl.

129. Sanz, A., Morales, A., and de la Higuera, M., and Cardenote, G. 1994. Sunflower meal comparated whith soybean meal as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)* diets: protein and energy utilization. Aquaculture, 128. 287:300.

130. Sargent, J., Henderson, R. and Tocher, D. 1988. The Lipids. In: Halver, J. (ed). Fish Nutricion- Second Edition: 154-219. Academic Press, INC. United States of America.

131. Sargent, J., Bell, J., McGhee, F., McEvoy, J., & Webster, J. 2001. The nutritional value of fish In: Farmed Fish Quality, Kestin S. C., Warriss P. D. (Eds.): Blackwell Science Ltd., Osney Mead Oxford OX2 0EL UK, pp. 3-12.

132. Satoh, S., Higos, D. A., Dosanjh, B. S., Hardy, R. W., Geoffery Eales, J., Deacon, G. 1998. Effect of extrusion processing on the nutritive value of canola meal for chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) in seawater. Aquaculture Nutrition, 4: 115–122.

133. Satoh, S., Takanezawa, M., Akimoto, A., Kiron, V. and Watanabe, T. 2002. Changes of phosphorus absorption from several feed ingredients in rainbow trout during growing stages and effect of extrusion of soybean meal. Fisheries Science, 68: 325–331.

134. Shearer, K. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. Aquaculture, 119, 63-88.

135. Sernapesca 2007. Anuarios estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Gobierno de Chile. www.sernapesca.cl.

136. SOFIA. 2006. State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 153 p.

137. Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* 3rd edition. W. H. Freeman and Co.: New York, 887 pp.

138. Sørensen, M., K. Ljøkjel, T. Storebakken, K.D. Shearer, A. Skrede. 2002. Apparent digestibility of protein, amino acids and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fish meal based diet extruded at different temperatures. Aquaculture, 211: 215–225.

139. Steffens, W. 1987. Principios fundamentales de la alimentación de peces. Editorial Acribia. España. 275 pp.

140. Stone, D.J., Allan, G., Parkinson, S., Rowland, S. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus* III. Digestibility and growth using meat meal products. Aquaculture, 186: 311–326.

141. Storebakken, T., Shearer, K.D., Refstie, S., Lagocki, S., McCool, J., 1998. Interactions between salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and

energy in rainbow trout_*Oncorhynchus mykiss*.. Aquaculture, 163, 347–359.

142. Storebakken, T., Shearer, K.D., Baeverfjord, G., Nielsen, B.G., Asgard, T., Scott, T.M., De Laporte, A., 2000a. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. Aquaculture, 184: 115– 132.

143. Storebakken, T., Refstie, S. and Ruyter, B., 2000b. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In Drackley, J.K. (Ed.), Soy in Animal Nutrition. Federation of Animal Science Societies, pp.127-170.

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

145. Sugiura, S., Babbitt, J., Dong, F., Hardy, R. 2000. Utilization of fish and animal by-product meals in low-pollution feeds for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research, 31(7): 585-593.

146. Tacon, A. 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fish meal and other fishery resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 35 pp.

147. Tacon, A.G.J. 1997a**.** Feeding tomorrow's fish: keys for sustainability. In: Feeding Tomorrow's Fish (A.G.J. Tacon and B. Basurco, editors). Cahiers Options Mediterraneennes, Vol. 22. Zaragoza, Spain. pp. 11-33.

148. Tacon, A. 1997b. Fishmeal Replacers: Review of antinutrients within oilseeds and pulses,a limiting factor for aquafeed green revolution?. In: Tacon, A. and Basurco, B (eds). Editions Cahiers options mediterranéennes, CIHEAM. Spain. Feeding tomorrow'sfish, (22) 153-182.

149. Tacon, A. 2002. Antinutritional Factors Limit Use of Plant Feedstuffs. Aquatic Feed and Nutrition 5, (6) 66-68.

150. Tacon A. J. G. 2005. State of information on salmon aquaculture feed and the environment. WWF. 80 pp. http://www.westcoastaquatic.ca.

151. Tacon, A. y Cowey, C. 1985. Protein and amino acid requeriments. En: P. Tytler and P. Calow (Eds.), Fish energetics, new perspectives. Cromm Helm, London, pp. 155-183.

152. Takeuchi, T., Masuda, R., Ishizaki, Y., Watanabe, T., Kanematsu, M., Imaizumi, K. and Tsukamoto, K. 1996. Determination of the

requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. Fisheries Science 62, (5) 760-765.

153. Thiessen, D., Campbell, G., and Adelizi, P. 2003. Digestibility and growth performance of juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. Aquaculture Nutrition, 9: 67-75.

154. Thodesen, J. & Storebakken, T. 1998. Digestibility of diets with precooked rye or wheat by Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. Aquaculture Nutrition, 4: 123–126.

155. Tocher, D.R., Bell, J.G., MacGlaughlin, P., McGhee, F., Dick, J.R., 2001. Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: effects of dietary vegetable oil. Comp. Biochem. Physiol., 130B: 257-270.

156. Torstensen, B.E., Lie, O., and Froylond, L. 2000. Lipid Metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. Lipids 32, 653-664 pp.

157. Trugo, L.C., Almeida, D.C.F., 1988. Oligosaccharide contents in the seeds of cultivated lupins. J. Sci. Food Agric. 45, 21– 24.

158. Twibell R. G. and Robert P. Wilson. 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture C.D. Webster and C.E. Lim (Editors), CABI Publishing, Wallingford Oxon, UK 448pp.

159. Veraguas, Jaime. 2007(comunicación personal) . Responsable de planta de alimentos de Cultivos Marinos Chiloe.

160. Van Barneveld, R.J., 1999. Understanding the nutritional chemistry of lupin Lupinus spp.) seed to improve livestock production efficiency. Nutr. Res. Rev. 12, 203– 230.

161. Vielma J. Makinen T., Ekholm P. and Koskela J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and algal availability of phosphorus load. Aquaculture, 183: 349-362.

162. Visión acuícola, 2006. Harina de pescado: ¿Insumo vital? Año 8 (81):18-24.

163. Visión acuícola, 2007. Agricultura y salmonicultura: un matrimonio indisoluble. Año 9 (86):10-19.

164. Von Baer, E., 2001. Separata del Lupino. Agenda del Salitre. SOQUIMICH. Chile 8pp.

165. Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, 73B (1): 3 -15.

166. Watanabe, T*.,* 2002*.* Strategies for further development of aquatic feeds. Fisheries Science**,** 68: 242-252.

167. Watanabe, T., Pongmaneerant, J., Sato, S. and Takeuchi, T., 1994. Replacement of fish meal by alternative protein sources in rainbow trout diets. Nippon Suisan Gakkaishi, 59: 1573-1579.

168. Williams, K., Barlow, C., Rodgers, L., Hockings, I., Agcopra, C. and Ruscoe, I., 2003. Asian seabass Lates calcarifer perform well when fed pelleted diets high in protein and lipid. Aquaculture, 225: 191-206.

169. Wurmann, C., 2000. La Acuicultura Comercial Chilena: Desafios, Oportunidades y Metas Hasta el 2020. Aquanoticias Internacional, 12 (58): 6-21.

170. Yañez, E., Ivanovic, D., Owen, D., Ballester, D., 1983. Chemical and Nutricional Evaluation of Sweet Lupines. Annals of Nutrition and Metabolism, 27: 513-520.

171. Zaldivar, J., 2004. Variaciones en la oferta de harina y aceite de pescado, competencia con otros destinos y una mirada a las nuevas exigencias internacionales. Conferencia Internacional Aqua Sur. Puerto Montt, Chile. 22-23 de marzo 2004. 10pp.

172. Zongjia J. Ch., Ronald W. A., 2003. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 218: 501–514.