

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE FUENTES DE PROTEÍNA
ALTERNATIVA A LA HARINA DE PESCADO EN DIETAS
DE ENGORDE PARA DORADA (SPARUS AURATA)**

LIDIA ESTHER ROBAINA ROBAINA

Las Palmas de Gran Canaria, 1995

25-1994/95
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO



Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por la Doctoranda las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE
Las Palmas de G. C., a 29 de abril de 1995.

El Presidente: Dr. D. Eladio Santaella Álvarez,

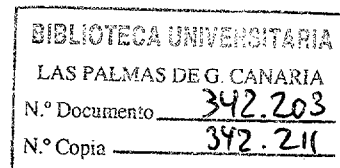
La Secretaria: Dr.^a D.^a Carmen M.^a Hernández Cruz,

El Vocal: Dr. D. Albert G. J. Tacon.

El Vocal: Dr. D. Emilio Pascual Vázquez,

El Vocal: Dr. D. José Manuel Vergara Martín,

La Doctoranda: D.^a Lidia Esther Robaina Robaina,



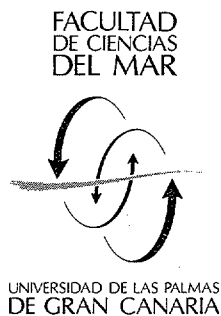
**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

TESIS DOCTORAL

**UTILIZACION NUTRITIVA DE FUENTES DE PROTEINA
ALTERNATIVAS A LA HARINA DE PESCADO EN DIETAS
DE ENGORDE PARA DORADA (*Sparus aurata*)**

**Memoria que presenta la Licenciada LIDIA ESTHER ROBAINA
ROBAINA 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, Abril 1995.



MARIA SOLEDAD IZQUIERDO LOPEZ, Dra. en Biología, Profesora Titular del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

HACE CONSTAR: que la presente memoria "Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*)" de la que es autora la licenciada en Ciencias del Mar, Dña. Lidia E. Robaina Robaina, ha sido realizada bajo mi dirección, habiendo sido revisada y aceptada 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, a 11 de marzo de 1995.



María Soledad Izquierdo López
DPTO. BIOL.



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA APLICADA
Unidad de Biología Animal



FCO. JAVIER MOYANO LOPEZ, DOCTOR EN BIOLOGIA Y PROFESOR TITULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE ALMERIA

HACE CONSTAR:

Que la presente Memoria "Utilización nutritiva de Fuentes Proteicas Alternativas a la Harina de Pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*)", de la que es autora la Licenciada en Ciencias del Mar Dña. Lidia Robaina Robaina, ha sido realizada bajo mi dirección, habiendo sido revisada y aceptada para su presentación para la colación del grado de Doctor en Ciencias del Mar en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

En Almería, a 8 de marzo de 1995



A MIS PADRES

RESUMEN

Utilización Nutritiva de Fuentes Proteicas Alternativas a la Harina de Pescado en Dietas de Engorde para Dorada (*Sparus aurata*).

En los últimos 30 años la Acuicultura ha experimentado un gran desarrollo, con el fin de abastecer a una población en continuo crecimiento, con unas demandas cada vez más altas de pescado. Desde un punto de vista nutricional, la proteína es el ingrediente dietario más importante en los piensos para peces (30-60% del peso seco), siendo en la actualidad la harina de pescado la fuente proteica utilizada en mayor proporción en los mismos. La producción de harina de pescado viene determinada por el nivel de recursos disponibles. En este sentido, la producción de harina y aceite de pescado se prevee que descienda bruscamente hacia el año 2000 mientras que, para ese mismo año, se estima una duplicación de la cantidad de harina de pescado necesaria en la producción de dietas para acuicultura, de seguir los piensos las fórmulas actuales.

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

Dentro de este contexto, en el presente trabajo se estudia la utilización nutritiva de niveles crecientes de cuatro fuentes proteicas, harina de soja, harina de altramuz, harina de gluten de maíz y harina de carne y huesos, alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada, especie que junto con la lubina ha experimentado el mayor crecimiento del sector en los últimos 20 años en Europa.

De manera general, los resultados muestran que, a los niveles de sustitución ensayados, las cuatro fuentes proteicas presentan tanto una buena utilización nutritiva como digestiva por los peces. Sin embargo, implicaciones a nivel histológico y aumentos en los niveles de excreción amoniacal al medio, limitan el nivel de inclusión de alguna de las harinas utilizadas en dietas para esta especie.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	V
1. INTRODUCCION	1
1.1. El cultivo de Dorada. Importancia del estudio de la nutrición de esta especie	1
1.2. Importancia de las proteínas en la dieta de los peces.	4
1.3. Evaluación de las proteínas dietéticas	7
1.4. Importancia y problemática de la harina de pescado como fuente proteica en piensos para peces	13
1.5. Fuentes alternativas de proteínas en piensos para peces.	17
1.6. Utilización metabólica de las proteínas; impacto ambiental de la acuicultura.	30
1.7. Objetivos.	33
2. MATERIAL Y METODOS.	34
2.1. Ingredientes	34
2.1.1. Selección	34
2.1.2. Tratamientos y controles de calidad	37
2.2. Preparación de las dietas	38
2.2.1. Formulación.	38
2.2.2. Elaboración	41
2.3. Condiciones experimentales generales y toma de muestras	41
2.3.1. Condiciones experimentales en ensayos de crecimiento y utilización nutritiva del alimento	43
2.3.2. Condiciones experimentales en ensayos de utilización digestiva del alimento	47
2.3.2.1. Recolección y tratamiento de heces	47
2.3.3. Condiciones experimentales en ensayos de excreción	

de amonio	48
2.4. Parámetros biológicos utilizados	48
2.4.1. Crecimiento	48
2.4.2. Eficacia bruta del alimento.	49
2.4.3. Utilización de la proteína	49
2.4.3.1. Coeficiente de eficacia proteica	49
2.4.3.2. Valor productivo de la proteína	49
2.4.4. Retención energética	50
2.4.5. Índice hepatosomático.	50
2.4.6. Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente.	51
2.5. Métodos analíticos de composición	51
2.5.1. Humedad	52
2.5.2. Ceniza.	52
2.5.3. Proteínas	52
2.5.4. Lípidos totales.	52
2.5.5. Fibra	53
2.5.6. Carbohidratos	53
2.5.7. Determinación de óxido crómico	54
2.5.8. Energía bruta	54
2.5.9. Determinación de la actividad antitripsica	54
2.5.10. Determinación de la solubilidad de las proteínas en KOH (0.2 %)	55
2.6. Determinación de la actividad de enzimas digestivas	55
2.6.1. Preparación de extractos	55
2.6.2. Actividad tripsica	55
2.6.3. Actividad amilásica	56
2.7. Determinación de niveles de excreción de amonio	56
2.8. Métodos histológicos	56
2.9. Tratamientos estadísticos	57
 3. EFECTO DE LA INCLUSION DIETETICA DE HARINAS DE SOJA, ALTRAMUZ, GLUTEN DE MAIZ Y CARNE Y HUESOS EN EL CRECIMIENTO Y UTILIZACION DEL ALIMENTO DE LOS JUVENILES DE DORADA.	 58

3.1. Justificación y objetivos	58
3.2. Experimento 1. Soja y altramuz	60
3.2.1. Introducción.	60
3.2.2. Condiciones experimentales	63
3.2.3. Resultados.	67
3.2.4. Discusión y conclusiones	76
3.3. Experimento 2. Gluten de maíz y harina de carne y huesos	81
3.3.1. Introducción.	81
3.3.2. Condiciones experimentales	82
3.3.3. Resultados.	86
3.3.4. Discusión y conclusiones	95
3.4. Experimento 3. Mejora de soja en base al experimento 1	99
3.4.1. Introducción.	99
3.4.2. Condiciones experimentales	108
3.4.3. Resultados.	114
3.4.4. Discusión y conclusiones	124
 4. UTILIZACION DIGESTIVA DE LAS DIETAS	 129
 4.1. Justificación y objetivos	 129
4.2. Experimento 4. Soja y altramuz	130
4.2.1. Introducción.	130
4.2.2. Condiciones experimentales	131
4.2.3. Resultados.	132
4.2.4. Discusión y conclusiones	134
4.3. Experimento 5. Gluten de maíz y harina de carne y huesos	138
4.3.1. Introducción.	138
4.3.2. Condiciones experimentales	139
4.3.3. Resultados.	139
4.3.4. Discusión y conclusiones	143
4.4. Experimento 6. Mejora de soja	147
4.4.1. Condiciones experimentales	147

4.4.2. Resultados.	147
4.4.3. Discusión y conclusiones	153
5. EXPERIENCIAS DE EXCRECION DE AMONIO	157
5.1. Justificación y objetivos.	157
5.2. Experimento 7. Soja y altramuza	159
5.2.1. Condiciones experimentales	159
5.2.2. Resultados.	159
5.2.3. Discusión y conclusiones	162
5.3. Experimento 8. Gluten y carne	166
5.3.1. Condiciones experimentales	166
5.3.2. Resultados.	166
5.3.3. Discusión y conclusiones	169
6. CONCLUSIONES GENERALES	172
7. BIBLIOGRAFIA	174
8. LISTA DE TABLAS	206
9. LISTA DE FIGURAS	210
10. ANEXOS	212

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. M^a Soledad Izquierdo, Profesora Titular del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, quien ha dirigido esta Tesis Doctoral. Su amistad, confianza, optimismo e inagotables ganas de saber me han animado en todo momento y han sido decisivos a la hora de valorar los resultados de este trabajo.

Mi mayor gratitud al Dr. Fco. Javier Moyano, Profesor Titular del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad de Almería, quien ha codirigido esta Memoria de Investigación. Su dedicación, paciencia y conocimiento sobre el tema han resultado ser insustituíbles.

Al Dr. José Manuel Vergara, Profesor Titular del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, con quien empecé a trabajar en este fascinante mundo de la Acuicultura. Gracias por su colaboración, consejos y ayuda prestada en todo momento.

Al Dr. Santiago Hernández, Profesor Titular del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por las facilidades concedidas desde un principio para la realización este trabajo.

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a D. Hipólito Fernández-Palacios, Técnico Superior del ICCM, por su compañerismo y generosidad demostrados a lo largo de todos estos años. Su invaluable experiencia y la confianza depositada en mi trabajo han sido inestimables.

A D. Juan Socorro, por su empeño, tenacidad y por las interminables horas empleadas ante el microscopio.

Quisiera dar "unas gracias muy especiales" al resto del personal del GIA de Gran Canaria, Dra. Carmen M^a Hernández, D^a. María Salhi, D. Antonio Valencia, D. Daniel

Montero, D. Moisés González, D^a Isabel Rodríguez, D^a. Lucía Molina, D^a. Guillermina López, D. Juan Suárez, D. Miguel Medina y D. Sergio Ramos. Cada uno de ellos me ha ayudado en distintos aspectos de este trabajo y han estado "ahí" en cualquier momento que los he necesitado.

A todo el personal del ICCM de Gran Canaria que, de una u otra forma, me han facilitado el trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Algología Aplicada de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en especial a los Drs. Juan Luis Gómez y Miguel Jiménez por su amistad y desinteresada colaboración en las ocasiones en que acudí a ellos.

A mis hermanos y toda mi familia quienes, en su mayoría, aún si entender bien lo que este trabajo representaba para mí, me han animado y apoyado incondicionalmente.

A Félix, gracias por estar a mi lado, ayudarme y apoyarme en todo momento. El, más que nadie, sabe lo que "nos" ha costado este trabajo.

Gracias de corazón a todos aquellos que involuntariamente he olvidado mencionar y que, en alguna medida, han participado en la realización de esta Tesis.

La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, mediante la concesión de una beca de Tercer Ciclo, ha financiado la mayor parte de los trabajos de investigación incluidos en esta Memoria. El Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria y el Gobierno Autónomo de Canarias han colaborado económicamente en el desarrollo de esta labor de investigación.

1. INTRODUCCION.

1.1. EL CULTIVO DE DORADA. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA NUTRICION DE ESTA ESPECIE.

La demanda de pescado y otros productos acuícolas ha experimentado un incremento mundial particularmente pronunciado en Europa y otras áreas desarrolladas. Durante el período 1967-1989, el consumo mundial aparente de productos pesqueros se ha incrementado aproximadamente de 10 a 13 kg per cápita y año (RHODES, 1993), sin embargo, la productividad total del océano es limitada, considerándose un máximo sostenible estimado de 150 millones de toneladas métricas (Tm) por año, probablemente sólo suficiente para suministrar el 10% de la proteína necesaria para el sostenimiento de la población mundial (MORROW, 1992). En base a este déficit en el suministro de productos del mar con el que abastecer a una población en continuo crecimiento, la acuicultura ha experimentado un gran auge en los últimos 30 años. Esto ha sido posible gracias al enorme esfuerzo dedicado a la investigación, al desarrollo de nuevas tecnologías, a la introducción de un número considerable de especies nuevas y a la gran inversión realizada en los sectores público y privado. Así, en 1990 la producción mundial en acuicultura llegó a duplicar la producción que había en 1975 (RHODES, 1993).

Las Naciones Unidas, a través de su Organización para el Alimento y la Agricultura (FAO), han estimado que la demanda de peces y crustáceos cultivados podría incrementarse de 5 a 11 millones de Tm entre los años 1986 y 2000 (FAO, 1987).

Aunque todavía las especies más tradicionales producidas en acuicultura tales como la carpa, la trucha, anguila y otros peces de agua dulce suponen más del 80% de la producción global, durante los últimos 20 años en Europa la producción se ha diversificado hacia otras especies, como el salmón, rodaballo, dorada y lubina. Las empresas dedicadas al cultivo de estas dos últimas son las que han experimentado el mayor crecimiento en el sector, con una producción que sobrepasó las 14000 toneladas en 1992 (SWEETMAN, 1993), estimándose en unas 35000 toneladas para 1995 (STEPHANIS y DIVANACH, 1993).

La dorada, *Sparus aurata* L., es un pez carnívoro marino típico de aguas templadas,

siendo la temperatura óptima para su desarrollo del orden de 23 a 25 °C. Es, por tanto, una especie que a nivel comercial presenta un gran potencial para el desarrollo de su cultivo en regiones cálidas, encontrándose éste bien desarrollado en los países ribereños del Mediterráneo (principalmente en España, Francia, Italia, Grecia e Israel), y en clara expansión en otros como Turquía, Túnez y Marruecos, en la región suratlántica de la Península Ibérica y Canarias. Hoy en día existen en España diversas explotaciones de dorada, tanto de carácter semiintensivo en estanques en tierra (esteros), como intensivo (bien en jaulas flotantes o bien en estanques en tierra).

Los datos de producción industrial, publicados por la Secretaría General de Pesca Marítima del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, indican que de un total de 2753.5 Tm de peces marinos cultivados en España en 1991, 1072.9 Tm (el 38.96%) correspondieron a dorada, que es desde 1988 la especie ictiológica más cultivada en nuestro país. En 1991 España produjo el 20% de las 6000 Tm de espáridos (fundamentalmente dorada) que se estima se comercializaron en el mercado europeo (IEO, 1992; FLOS, 1992). Por lo que respecta a Canarias, existen cinco empresas dedicadas al engorde de dorada, con una producción aproximada a las 300 Tm en 1992.

A nivel comercial, el principal objetivo de la producción de peces es el de maximizar el crecimiento y la supervivencia al mínimo costo (KNIGHTS, 1985), siendo condición necesaria la óptima satisfacción de los requerimientos fisiológicos y metabólicos de los organismos objeto de cultivo, proveyéndolos de unas condiciones ambientales favorables y alimentándolos con dietas adecuadas (STEFFENS, 1987). Sin embargo, una de las principales limitaciones para el desarrollo de la acuicultura la suponen el coste y la disponibilidad del alimento (JAMES, 1992). Puesto que la alimentación representa uno de los mayores gastos en la producción intensiva de peces, el desarrollo de dietas comerciales capaces de satisfacer los requerimientos de la especie cultivada bajo unas condiciones determinadas y con el menor coste posible, es considerado como uno de los principales objetivos en las investigaciones en acuicultura (TIEWS et al., 1979; HARDY, 1989).

El conocimiento sobre las necesidades nutricionales de la dorada es muy limitado, basándose una gran parte de ellos en los determinados para la dorada japonesa, *Chrysophrys major*. Las primeras investigaciones fueron encaminadas a determinar los requerimientos

cuantitativos de proteína, encontrándose que era necesario un nivel del 40% para el crecimiento óptimo de peces de 3 g (SABAUT y LUQUET, 1973). Los mismos autores determinaron los niveles mínimos necesarios para cinco aminoácidos esenciales expresados como porcentaje de la proteína dietaria: arginina <2.6, lisina 5.0, metionina + cistina 4.0 y triptófano 0.6 (LUQUET y SABAUT, 1974). Posteriormente, los requerimientos de proteína determinados para esta especie en alevines de 0.8 g y juveniles de 60 g de peso medio inicial fueron de 55% y 42% respectivamente (VERGARA, 1992); este autor sugiere que las diferencias de resultados con trabajos anteriores fueron debidas posiblemente a la utilización de distintas técnicas para el análisis de los datos obtenidos. KISSIL y KOVEN (1987), ensayaron dietas semipurificadas y purificadas para dorada encontrando que la adición de suplementos aminoacídicos a dietas base con caseína como fuente de proteínas, mejoraba el crecimiento. Otros estudios (YONE y FUJII, 1975a; KANAZAWA et al., 1979; YAMADA et al., 1980) sugieren que la dorada, al igual que la dorada japonesa, parece utilizar mejor aceites de origen marino (KOVEN y KISSIL, 1984). En este sentido, MARAIS y KISSIL (1979) no encontraron una mejora en el crecimiento cuando usaron aceite de soja como principal fuente de lípidos, ni tampoco KALAGEROPOULOS et al. (1992), quienes sustituyeron el aceite de pescado por aceite de maíz. De todo ello se deduce que esta especie necesita ácidos grasos poliinsaturados de más de 20 carbonos de la familia del linolénico, n-3 HUFA. El requerimiento de ácidos grasos esenciales para los alevines y juveniles de esta especie se estima entre 0.9 y 1.9 % respectivamente de n-3 HUFA (KALAGEROPOULOS et al., 1992; IBEAS et al., 1994).

KISSIL y GROPP (1984) mostraron que la mejor relación proteína/energía (P:E) para doradas de 45 g era de 25 mg/kj (40% proteína / 5% lípidos), y 23 mg/kj (44/10) para alevines de 3 g. Posteriormente, PEREIRA et al. (1987) obtuvieron para esta misma relación un valor de 51/14 para doradas de 1 a 6 g. Finalmente, en el área de los requerimientos vitamínicos se dispone sólo de información sobre aquellos para piridoxina (Vit. B6), 3 a 5 mg/kg de dieta seca (KISSIL, 1981).

Aparte de estas investigaciones muy poco más se sabe sobre los requerimientos dietarios para dorada, siendo sus piensos comerciales formulados, como ocurre en otras especies cultivadas, en base a los requerimientos establecidos para salmónidos.

1.2. IMPORTANCIA DE LAS PROTEINAS EN LA DIETA DE LOS PECES.

El valor de una dieta depende de los niveles y disponibilidades de más de 40 nutrientes necesarios para los peces. Entre ellos, las proteínas constituyen el material orgánico más abundante en el tejido de los peces, representando entre un 65-75% del total corporal en peso seco (HALVER, 1989).

Las necesidades de proteínas y aminoácidos para los peces han sido revisadas por diferentes autores (NRC, 1977; HALVER y TIEWS, 1979; TACON y COWEY, 1985). En general, los peces necesitan un alto contenido de proteínas en la ración que oscila entre un 35-55%, o lo que es lo mismo, un equivalente del 45-75% del contenido en energía bruta de la dieta debería estar incluido en forma de proteína (TACON y COWEY, 1985).

Cuando se formula un pienso comercial para peces carnívoros cultivables, la proteína como componente dietario tiene una especial relevancia tanto cuantitativa como cualitativamente. En este sentido, establecer los requerimientos de proteína en la dieta de la especie a cultivar (mínimo nivel de proteína expresado como porcentaje del peso seco de la dieta que produce un máximo crecimiento, PANDIAN y VIVEKANANDAN, 1985), es esencial para poder diseñar un pienso artificial bien equilibrado con el que obtener una alimentación rentable (DE LA HIGHERA, 1989).

Estudios previos indican que las necesidades de proteína varían entre las diferentes especies de peces y dentro de la misma especie, según las diferentes fases de desarrollo del pez (DELONG et al., 1958; OGINO y SAITO, 1970; COWEY et al., 1972; NOSE y ARAI, 1972; SABAUT y LUQUET, 1973; SATIA, 1974; DABROWSKI, 1977), y que la fuente de energía así como el nivel energético de las dietas afectan a la eficacia de utilización de las proteínas (COWEY et al., 1975; ADRON et al., 1976; GARLING y WILSON, 1976; OGINO et al., 1976).

El valor energético de una dieta para el pez es especialmente difícil de definir, debido a las interacciones que ocurren entre los nutrientes derivados del alimento, después de que hayan sido absorbidos desde el tracto digestivo. Sin embargo, es particularmente importante definir el valor energético de la dieta ya que distintos autores afirman que los peces regulan

su ingesta alimenticia en función de satisfacer sus requerimientos energéticos. De esta forma, la ingesta de todos los nutrientes se verá regulada por el nivel de energía disponible de la dieta (WATANABE, 1988).

Los estudios sobre los requerimientos óptimos dietarios de proteína para los peces son complicados, ya que éstos se ven afectados por la composición de las dietas y las condiciones experimentales (MAZID et al., 1979). En realidad, como mostraron WILSON (1985), WILSON y HALVER (1986) y HALVER, (1989), los peces como otros animales no tienen un requerimiento de proteína "per se", sino un requerimiento por una mezcla bien equilibrada de aminoácidos disponibles a partir de la dieta mediante la digestión de las proteínas.

La proteína consumida por los peces es hidrolizada en aminoácidos, los cuales son absorbidos en el tracto intestinal y usados por varios tejidos para sintetizar nuevas proteínas. Por otra parte, los aminoácidos en exceso son utilizados como fuente de energía. Por ello, niveles en defecto de proteína en la dieta resultan en una reducción del crecimiento e incluso una pérdida de peso. En contraposición, cuando la dieta contiene proteína en exceso sólo una parte es usada para síntesis proteicas, siendo el remanente degradado para obtener energía (WILSON y HALVER, 1986).

De entre los 20 aminoácidos existentes en la naturaleza, una serie de ellos no pueden ser sintetizados "de novo" por el organismo debido a la complejidad de sus esqueletos carbonados, por lo que deben ser aportados continuamente en la ración, correspondiéndoles el nombre de **aminoácidos esenciales o imprescindibles** (NOSE et al., 1974). COWEY (1979) ha revisado los requerimientos de aminoácidos de los peces, concluyendo que todos los peces estudiados requieren los mismos diez aminoácidos esenciales (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina), variando sólo ligeramente los requerimientos cuantitativos de los mismos entre las diferentes especies.

Los aminoácidos esenciales más críticos son la lisina, metionina y cistina, treonina y arginina. En general se ha podido comprobar que si los requerimientos para estos aminoácidos son satisfechos, los otros aminoácidos esenciales estarán probablemente en exceso (AKIYAMA, 1988).

La determinación cuantitativa de los requerimientos en aminoácidos resulta complicada, puesto que existen interacciones entre ellos, así como con otros compuestos (STEFFENS, 1987). Para asegurar un aporte óptimo al organismo, los aminoácidos, esenciales y no esenciales, deben hallarse en una determinada relación mutua. Si ciertos aminoácidos se encuentran presentes en exceso en la ración, se originan trastornos metabólicos (desequilibrio aminoacídico) que en casos extremos pueden incluso ocasionar estados de toxicidad (BERGNER y KETZ, 1969 en STEFFENS, 1987).

De los aminoácidos esenciales dos de ellos, metionina y fenilalanina, pueden ser reemplazados por cistina y tirosina respectivamente, reduciendo la cantidad necesaria de los dos primeros para un máximo crecimiento. Aproximadamente un 50% de la fenilalanina requerida por el pez puede ser sustituida por tirosina, mientras que un 50-60% del requerimiento de metionina puede ser sustituido por cistina (MILLIKIN, 1982). Por ello, según WILSON (1986) se podría decir que los peces presentan más bien un requerimiento por el conjunto total de aminoácidos sulfurados, que un requerimiento específico de metionina. Los valores establecidos para las necesidades de aminoácidos sulfurados o metionina revelan algunas diferencias entre distintas especies. Así, el salmón chinook y la dorada requieren los valores más altos de aminoácidos sulfurados, aproximadamente el 4% de la proteína, mientras que el pez gato es el que requiere menos, 2.3% de la proteína. El resto de los peces estudiados requieren aproximadamente el 3% de la proteína. El valor de sustitución de la metionina por cistina ha sido determinado como aproximadamente el 60% para el pez gato (HARDING et al., 1977), y el 40% para trucha arco iris (KIM et al., 1984), sobre la base de los aminoácidos sulfurados.

En términos generales cabe esperar que la composición en aminoácidos de la proteína corporal de los peces sea una buena referencia de las necesidades cuantitativas de aminoácidos de estos animales (RUMSEY y KETOLA, 1975). En este sentido, COWEY y TACON (1983), describieron para carpa una correlación entre las necesidades en aminoácidos esenciales determinados mediante estudios de crecimiento y la proporción de esos mismos aminoácidos en la proteína corporal total. Esto ha sido corroborado por otros autores (OGATA et al., 1983; COWEY y LUQUET, 1983; WILSON y POE, 1985c). Esos datos indican que el patrón de aminoácidos de la proteína corporal puede muy bien servir para formular dietas experimentales en aquellas especies donde datos de requerimientos de

aminoácidos no son disponibles. Este podría ser el caso de la dorada, para la que según se vio anteriormente sólo se conocen los requerimientos de Arg., Lis., Met. + Cis. y Trp.

Por otro lado, aunque el crecimiento debe ser considerado como un incremento neto de cualquiera de los constituyentes corporales, la continua elaboración de tejido no puede llevarse a cabo sin un adecuado aporte de proteínas. En consecuencia, la retención de N (síntesis proteica) más que la retención de carbono o la retención calórica ha sido considerada como la unidad fundamental de crecimiento (BRODY, 1945; MAYNARD and LOUSLI, 1962 en STEFFENS, 1987).

1.3. EVALUACION DE LAS PROTEINAS DIETETICAS.

Cuando las proteínas son hidrolizadas con soluciones ácidas o alcalinas, o con enzimas, se obtienen aproximadamente unos 20 aminoácidos. Esos aminoácidos son pues, los productos finales de la digestión de las proteínas. Esto indica claramente que la calidad de las proteínas vendrá definida por la calidad y cantidad de aminoácidos así como por la biodisponibilidad de los mismos. A través del epitelio intestinal, los productos de la digestión proteica, principalmente aminoácidos libres, alcanzan el torrente sanguíneo. Esos aminoácidos absorbidos pueden seguir las siguientes rutas:

- 1) Ser incorporados al pool metabólico de aminoácidos libres, siendo mezclados con los aminoácidos libres originados en diferentes tejidos del organismo.
- 2) Los aminoácidos en el pool metabólico pueden entrar en las rutas de síntesis de proteínas y a su vez los aminoácidos derivados de la degradación de las proteínas son incorporados al pool metabólico de aminoácidos libres, reflejando el balance neto de las proteínas corporales.
- 3) Pueden entrar a participar en las rutas de síntesis de compuestos nitrogenados, tales como ácidos nucleicos, hormonas y enzimas.
- 4) Pueden ser desaminados, originando cadenas hidrocarbonadas y grupos amino.
- 5) Las cadenas hidrocarbonadas resultantes pueden ser oxidadas para obtener energía o entrar en las rutas de síntesis de lípidos, glúcidos e incluso aminoácidos.

- 6) Los grupos amino liberados de los aminoácidos son excretados como componentes nitrogenados tales como urea y amonio. (WATANABE en Fish Nutrition and Mariculture).

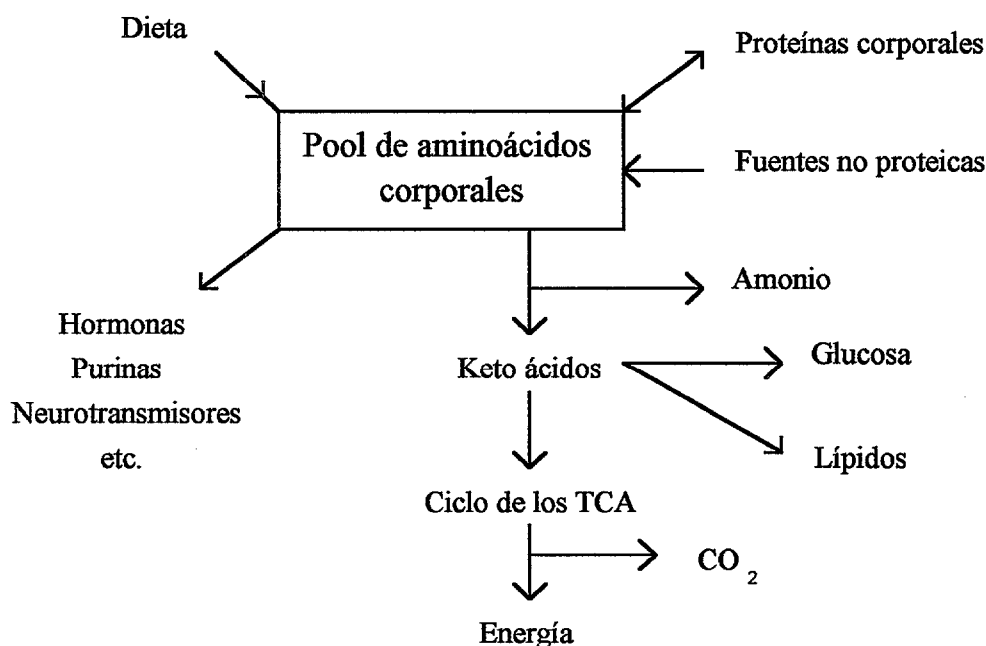


Fig. 1. Rutas en el metabolismo de aminoácidos en peces.

Las tasas de síntesis de proteínas son más altas en hígado, branquias, tracto digestivo, riñón y bazo, que en corazón y músculos blanco o rojo (FAUNCONNEAU, 1980; SMITH, 1981). Pero, aunque la tasa del metabolismo de las proteínas es más baja en el músculo que en el hígado, la masa muscular excede en tal grado a la de otros tejidos que resulta cuantitativamente el sitio más importante para la síntesis de proteína en todo el cuerpo. Asimismo, gran parte de la degradación y el catabolismo de los aminoácidos ocurre en el músculo (HEPHER, 1988).

La **efectividad de una dieta** formulada sobre la base de los requerimientos energéticos y de nutrientes puede ser evaluada mediante la determinación del peso ganado, eficacia

alimenticia (peso ganado(g)/alimento ingerido(g)) o conversión del alimento (alimento ingerido(g)/peso ganado(g)), así como a través del análisis de la composición corporal de los peces que han recibido la dieta en unas condiciones de cultivo determinadas. La eficacia de las proteínas y de cualquier ingrediente en una dieta puede ser evaluada siguiendo el siguiente esquema:

- 1) Análisis de la composición de los ingredientes.
- 2) Determinación de las digestibilidades de los ingredientes.
- 3) Formulación y reformulación de dietas balanceadas en la que se combinen diferentes ingredientes.
- 4) Observación de los niveles de productividad conseguidos con tales ingredientes.
- 5) Determinación de ingesta y peso ganado y cálculo de la eficacia alimenticia.
- 6) Cálculo de la eficacia en la retención de energía y nutrientes mediante el análisis de las carcasas.

La calidad de una proteína es evaluada usualmente a partir de **métodos biológicos y/o químicos**, mediante fórmulas en las que el peso corporal ganado y la retención de nitrógeno son usados como criterio para evaluar la calidad de la proteína. En los métodos biológicos, la tasa de eficacia proteica (PER), el valor biológico (BV) y la utilización neta de las proteínas (NPU) son los usados más frecuentemente. El valor biológico de una proteína puede variar considerablemente dependiendo de la calidad de la misma, así como de la capacidad de asimilación por cada organismo (OGINO y CHEN, 1973a,b).

Desde el punto de vista de los aminoácidos esenciales la calidad de las proteínas puede ser evaluada usando diferentes criterios, tales como el índice de aminoácidos esenciales, calculados en relación al perfil de aminoácidos requerido por una especie determinada. Este perfil de aminoácidos esenciales debería también tener en cuenta la posibles interacciones entre aminoácidos (KAUSHIK, 1989).

El análisis de los cambios en la síntesis proteica ya sea en todo el cuerpo del pez como en el músculo, debido a la cantidad y calidad del alimento es una buena medida para estimar la calidad de la proteína y su valor biológico (FAUNCONNEAU, 1985, en Nutrition and Feeding in Fish).

En la práctica, el **valor nutritivo real** de un alimento suele ser menor que el calculado mediante análisis químico, lo que indica que parte de los nutrientes pueden hallarse en estado "no disponible". Las digestibilidades de los ingredientes indican la energía y nutrientes "potencialmente disponibles" para el mantenimiento, crecimiento y reproducción del animal. Al mismo tiempo, también determinan el nivel de nutrientes no digestibles, que pasarán a formar parte de las excreciones sólidas que constituyen la mayor proporción de las excreciones producidas en acuicultura (CHO, 1991).

La **tasa de digestibilidad de una proteína** es una de las características prioritarias para evaluar su posible inclusión en una dieta. En los peces, no obstante, la medida de este parámetro viene condicionada por las dificultades impuestas por el medio acuático, en la recogida de heces. Este problema ha dado lugar a una serie de técnicas, más o menos precisas, para la recogida de las mismas, combinadas con métodos directos o indirectos para el cálculo de la digestibilidad. La recogida por presión abdominal (stripping) (NOSE, 1960), disección de los animales (INABA et al., 1962; WINDELL et al., 1978a), mantenimiento en cámaras metabólicas análogas a las empleadas con roedores (SMITH, 1971), filtración continua mediante un sistema de coladores rotatorios que retiran las heces del agua efluente de los tanques (CHOUBERT et al., 1979), o columnas de sedimentación de heces (CHO et al., 1975, 1982), son algunas de las técnicas ideadas para esta medición.

Aunque cada uno de estos sistemas o métodos desarrollados para la obtención de material fecal producido por los peces cuenta con una serie de ventajas e inconvenientes, merece especial atención por su amplia difusión el último de ellos, el desarrollado por CHO et al. (1975, 1982) y conocido como **Guelph System (CYAQ-2)**, el cual permite medir digestibilidades mediante la colección del material fecal recogido en una columna de decantación anexa al tanque de cultivo. Este método ha sido criticado especialmente por una supuesta disolución de nutrientes del material fecal en el agua (leaching). Sin embargo, las digestibilidades obtenidas para la materia seca, proteína cruda y lípidos por disección intestinal y colección del contenido rectal, y las obtenidas mediante el sistema CYAQ-2, indican que el "leaching" no es una importante fuente de error en la utilización de este último sistema. La ruptura de las heces ("break up") como resultado del manejo manual de las mismas es el principal factor desencadenante del proceso de leaching, el cual mediante el sistema CYAQ-2 ha sido evitado (CHO et al., 1985).

Los **métodos indirectos**, quizá los más utilizados, conllevan la estimación de las digestibilidades a través de la introducción de un marcador inerte en el alimento que ha de cumplir los siguientes requisitos:

- 1) No afectar presumiblemente a la fisiología de la digestión.
- 2) Moverse a través del tracto digestivo al mismo ritmo que el resto de los ingredientes.
- 3) No ser absorbido por el animal.

En el caso de usar este método indirecto de determinación de la digestibilidad, la problemática se "reduce" a obtener una muestra suficiente de heces, que sea representativa de las emitidas naturalmente, de tal forma que los cambios en las proporciones de nutriente y marcador en las dietas y heces permiten determinar la digestibilidad de dicho nutriente.

El óxido crómico (Cr_2O_3), propuesto por EDIN (1918), es el marcador más utilizado en estudios realizados con peces, el cual mezclado en una proporción conocida al preparar las dietas y medido en las heces, provee una estimación global de las digestibilidades en una dieta. Otros marcadores de este tipo son la celulosa (BUDDINGTON, 1979), el magnesio (KLEKOWSKI y DUNCAN, 1975), la materia orgánica resistente a la hidrólisis, esencialmente celulosa y quitina (BUDDINGTON, 1980; DE SILVA y PERERA, 1983), la fibra bruta (TACON y RODRIGUEZ, 1984), y la ceniza resistente a la hidrólisis (DE SILVA Y PERERA, 1983).

Mediante la digestibilidad aparente del alimento, el análisis de las carcasas, la cuantificación del alimento ingerido y el crecimiento, es posible determinar la proporción de nutrientes retenida en el pez y la excretada como desechos sólidos y solubles. El modelo de esta aproximación nutricional puede ser usado para predecir las excreciones cuantitativas y cualitativas producidas por operaciones en acuicultura. Esto provee una base para eliminar los complicados, costosos e inseguros procedimientos limnológicos, así como los medios para mitigar esos efectos (CHO, 1991).

En el contexto de la nutrición de peces, los coeficientes de digestibilidad son afectados muy poco por factores bióticos y abióticos, siendo los coeficientes de digestibilidad individuales aditivos (CHO y KAUSHIK, 1990). De esta forma, el contenido final en energía

y nutrientes digestibles, y las excreciones sólidas producidas por un pienso pueden predecirse a partir de los coeficientes de digestibilidad bien de la dieta o de la suma de sus ingredientes, junto con las cantidades de alimento ingerido.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de muchos ingredientes proteicos son bastante altos (80-95%) (CHO y SLINGER, 1979; CHO et al., 1982), pudiendo variar principalmente en función de la especie, la edad de los peces, la temperatura, el oxígeno disuelto, el tipo de proteínas presente en la dieta (CASTRO et al., 1993), la calidad de la proteína, la cantidad de proteína (SHIAU y HUANG, 1989) y la interacción con otros ingredientes dietarios. En este sentido se ha comprobado que la digestibilidad aparente de la proteína, de la materia orgánica y de la materia seca están fuerte e inversamente correlacionadas con el contenido de fibra contenido en el alimento (N.R.C., 1977). En el caso de los lípidos también se ha establecido una significativa correlación positiva entre el nivel de los mismos en las dietas comerciales y los coeficientes de digestibilidad de la materia orgánica (PIMENTEL- RODRIGUEZ, 1994).

Por otro lado, WILSON et al. (1981) encontraron la existencia de una razonable semejanza entre los valores de digestibilidad aparente de las proteínas y los valores medios de digestibilidad aparente de los aminoácidos que las componían; sin embargo, las digestibilidades de los aminoácidos individuales fueron diferentes en las distintas fuentes proteicas ensayadas. De esta manera, para la harina de soja mostraron que la digestibilidad aparente media de los aminoácidos era de 83.7% y la digestibilidad aparente de la proteína era del 76.6%; para la harina de carne y huesos la digestibilidad aparente media de los aminoácidos fue de 74.3%, lo cual estaba de acuerdo con los valores obtenidos por HASTINGS (1966) de digestibilidad de esta fuente proteica (75%). En resumen, se puede asumir según estos resultados, que a la hora de formular una dieta, el valor de digestibilidad de su proteína sugerirá de manera razonable una medida de la digestibilidad media aparente de sus aminoácidos, aunque se debe tener en cuenta que las digestibilidades de los aminoácidos individuales son diferentes para las distintas materias primas. La Tabla 1 muestra los coeficientes de digestibilidad aparente así como los valores de energía digestible para diferentes ingredientes medidos en trucha arco iris.

En cualquier caso, factores diversos bien de tipo nutricional (volumen total de la ingesta,

proporción de proteína en dieta, velocidad de tránsito a través del tracto digestivo, etc.) o bien inherentes al diseño y metodología experimentales, hacen que en la bibliografía aparezcan datos de digestibilidad muy diferentes para una misma fuente proteica, por lo que los valores usados como referencia han de emplearse siempre a título orientativo.

Por otro lado, el valor nutricional de las proteínas puede verse también afectado considerablemente por la sensibilidad de las enzimas digestivas a las posibles sustancias inhibitoras, frecuentes sobre todo en alimentos de origen vegetal. Por último, reacciones tales como las reacciones de Maillard ($\alpha 1-4$) que pueden tener lugar durante el período de almacenamiento y los tratamientos con calor a que son sometidos con frecuencia las materias primas, también pueden hacer disminuir la disponibilidad de los aminoácidos contenidos en los ingredientes por formación de aminoácidos azucarados no asimilables y destrucción de los aminoácidos más sensibles al calor. La lisina, cistina y arginina son los principales aminoácidos afectados por estos procesos.

1.4. IMPORTANCIA Y PROBLEMÁTICA DE LA HARINA DE PESCADO COMO FUENTE PROTEICA EN PIENSOS PARA PECES.

La harina de pescado es una materia prima de origen animal de elevada concentración proteica, con un valor nutritivo relativamente superior a otras harinas, tanto de origen animal como vegetal, por su excelente equilibrio en la composición de aminoácidos, su adecuada composición en ácidos grasos para todos los peces, su contenido en vitaminas del grupo B, elevadas concentraciones de ácido fosfórico e incluso la posible existencia de un "factor de crecimiento no identificado". Todas estas cualidades le confieren un importante papel en el mercado mundial de alimentación animal en piensos para peces, cerdos, aves, vacas productoras de leche y visones, principalmente en la alimentación de las etapas más tempranas de las diferentes especies para las que se utiliza.

La harina de pescado requerida para la producción de piensos para acuicultura (crustáceos incluidos) supone alrededor de un 10% de la producción mundial de esta materia prima, y se espera que se duplique hacia el año 2000.

Tabla 1. Coeficientes de digestibilidad aparente y valores de energía digestible de diferentes ingredientes medidos en trucha arco iris* (CHO, 1991).

Ingredientes	Nº Internac.	Coeficientes de digestibilidad **				D.E. ** Mj/kg
		M.S. %	Prot. %	Líp. %	G.E. %	
Harina de alfalfa	1-00-023	39	87	71	43	7.7
Harina de sangre	5-00-381	91	99	-	89	19.4
Levadura de cerveza seca	7-05-527	76	91	-	77	13.9
Maíz	4-02-935	23	95	-	39	6.6
Harina de gluten de maíz	5-09-318	80	96	-	83	17.6
Harina de plumas	5-03-795	75	58	-	70	15.7
Harina de pescado (arenque)	5-02-000	85	92	97	91	18.8
Harina de carne y huesos	5-09-321	78	85	73	85	15.0
Harina de subprod. de pollería	5-03-798	52	68	79	71	13.9
Harina de semillas de colza	5-03-871	35	77	-	45	8.1
Harina de soja	5-04-597	78	96	94	85	19.0
Harina de soja desengrasada	5-04-612	74	96	-	75	13.5
Harina de trigo	5-05-205	35	92	-	46	7.6
Suero deshidratado	4-01-182	97	96	-	94	13.4
Almidón crudo		37	-	-	49	8.6
Almidón gelatinizado		86	-	-	86	13.3
Concentrado proteico de pescado		90	95	-	94	17.2
Concentrado proteico de soja		77	97	-	84	15.4

* Todos los valores son medias de datos recopilados.

** Coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (M.S.), proteínas (Prot.), lípidos (Líp.) y energía bruta (G.E.). Energía digestible de los ingredientes (D.E.).

Según BARLOW (1989), se estima que si en el futuro la formulación y producción de dietas prácticas para peces sigue las tendencias actuales, los requerimientos de harina y aceite de pescado para alimentos en acuicultura alcanzarán de 1 a 1.5 millones de Tm en el año 2000.

La producción de harina de pescado viene determinada por el nivel de recursos disponibles. Los relativamente pocos productores y exportadores de harina de pescado se concentran en la explotación de un pequeño número de especies, siendo por consiguiente la producción anual de harina de pescado dependiente del comportamiento de esas especies. Este tipo de producción trae consigo un tipo de mercado muy inestable, con unas disponibilidades y precios fluctuantes entre un año y otro.

Después de años de continua expansión, las capturas mundiales de pescado descendieron en 1990. En ese año se notificó una captura de 97 millones de Tm, que contrasta con los casi 100 millones de Tm que fueron producidas en 1989. El factor principal que contribuyó a este descenso fue la reducción de casi 2 millones de toneladas en la captura del pelágico pequeño en el Pacífico sudoriental, la cual se utilizan normalmente para producir harina de pescado.

Las capturas totales de origen pesquero comenzaron a fluctuar en la década de los sesenta y alcanzaron una fase crítica en la década de los setenta, debido principalmente al colapso de los stocks de anchoveta peruana. En la década de los 80, las capturas empezaron a incrementarse de nuevo, alcanzando un pico en 1989. Este resurgimiento de las pesquerías a nivel mundial no fue debido a un incremento general de los stocks de peces marinos, sino más bien a la renovada explotación de los stocks pelágicos de especies del tipo del arenque y del bacalao.

Los factores (SPINELLI et al., 1979; COLL MORALES, 1986) que tienden a disminuir la oferta relativa de harina de pescado en el mercado mundial son:

- Limitación de la exportación de harina de anchoa peruana en 1973. Inicio de la crisis.
- Crecimiento de las actividades en acuicultura.
- Aumento del consumo directo de peces de bajo valor.
- Disminución de capturas.
- Establecimiento de la Zona Económica Exclusiva de las 200 millas en muchos países.

La producción de harina y aceite de pescado se espera disminuya en un 5% para el año 2000 (BARLOW, 1989). En la actualidad el mercado mundial de harina de pescado se caracteriza por un pequeño número de exportadores especializados que suministran a un gran número de países importadores. Europa y Japón son los mercados con mayor demanda de esta harina. Aunque Japón es el mayor productor mundial de harina de pescado, su excesiva demanda le obliga a ser uno de los mayores compradores (6% de las importaciones mundiales) (en MOYANO, 1990).

A pesar del descenso en el suministro de harina de pescado, y al incremento de la demanda, a partir de finales de los 80 los precios han bajado sustancialmente, aunque se observó un pequeño aumento en la segunda mitad de 1990. La razón para estos precios tan bajos se debe al incremento en la producción de harina de soja, la cual se ha erigido como principal competidor de la harina de pescado. En este sentido, desarrollos tecnológicos en el campo de la agricultura han permitido un aumento considerable en la producción de harinas de semillas de oleaginosas en todo el mundo, superando incluso la demanda de las mismas. En este sentido, la producción mundial de soja se incrementó de 45 millones de Tm en 1969-1971 a 101 millones de Tm en 1985 (VOHRA y KRATZER, 1991).

A comienzos de octubre de 1990 se produjeron records en los stocks de soja en los tres principales países productores (USA, Brasil y Argentina), siendo la producción un 33% más alta que en el año anterior. Aún con todo ello, aunque el precio de la harina de pescado no sube de manera proporcional de acuerdo con la relación oferta/demanda de la misma, las características inherentes a ésta hacen que su precio sea siempre superior al de la harina de soja (en MOYANO, 1990).

Al inconveniente del elevado costo de las harinas de pescado habría que sumar los problemas añadidos por su variabilidad en cuanto a disponibilidad y a composición a lo largo del año, y entre unos años y otros (COLL, 1986).

Todos estos problemas en el mercado de la harina de pescado afectan directamente a los productores de peces. Así tenemos que después de una fase inicial eufórica en la que primaba la falta de competencia de los productos producidos en acuicultura, la relación oferta/demanda ha sufrido un gran cambio, con el consecuente abaratamiento de los precios

de mercado. Esta reducción de los precios ha producido el que los beneficios esperados por las empresas se hayan visto mermados. Entre 1987 y 1991 los costes de producción aumentaron una media de alrededor de un 17% anual, mientras que los precios de venta de los productos sólo subieron aproximadamente un 6% anual. Como consecuencia de esto, los márgenes de ganancia comparados con los niveles de 1987 se han visto reducidos a casi la mitad para la lubina y a 1/3 para la dorada. En adición a esto, la competitividad de estos productos se ve agravada durante los meses de septiembre a marzo, época en que aumentan las capturas pesqueras de estas especies (STEPHANIS y DIVANACH, 1993).

1.5. FUENTES ALTERNATIVAS DE PROTEINAS EN PIENSOS PARA PECES.

Como se ha visto anteriormente, desde un punto de vista nutricional ha sido establecido que, independientemente de la especie, la proteína es el ingrediente dietario más importante (30-60% del peso seco) y dentro de ella, la harina de pescado continúa siendo la mayor fuente utilizada (20-60% de la dieta). A la vista del elevado costo de las harinas de pescado no es de sorprender que el coste del alimento suponga de entre un 40-60 % del total de los costes de producción en empresas dedicadas a la acuicultura intensiva (FAO, 1983), lo cual supone uno de los mayores inconvenientes para una mayor expansión de la acuicultura.

Dentro de este contexto se vienen haciendo serios esfuerzos en diferentes países con el fin de reducir el coste de la harina de pescado en dietas prácticas para peces, tanto desde el punto de vista de la reducción del nivel de proteína en si mismo a través de sustituciones con otros nutrientes (protein-sparing), como a través del uso de fuentes alternativas de proteínas de elevado valor nutricional como sustitutos de la harina de pescado (LUQUET y KAUSHIK, 1978; KAUSHIK, 1989 en Progress in Fish Nutr.).

Hoy en día muchos nutricionistas y productores de piensos concentran sus esfuerzos en la selección entre la amplia variedad de productos disponibles en la industria de alimentación animal, de aquellos que pueden ser usados para la elaboración de alimentos de menor costo para la producción de peces. TACON y JACKSON (1985) entre otros, han hecho una revisión de las fuentes proteicas, tanto convencionales como no convencionales, usadas en dietas prácticas para peces.

Debemos considerar, como vimos anteriormente, que la harina de pescado es la fuente de proteína disponible cuyo perfil de aminoácidos más se aproxima a los requerimientos dietarios de los peces. Consecuentemente, no es de sorprender que los intentos por reemplazar toda la harina de pescado con cualquier otra fuente de proteína alternativa individual no hayan sido muy fructíferos.

Aunque en algunos casos, la **sustitución parcial de la harina de pescado** por otras fuentes de proteína en las dietas para peces no llegase a reducir el precio del alimento, si **reduciría la dependencia total de la harina de pescado** en las industrias productoras de piensos. Con ello se aseguraría el suministro a los productores de peces de **dietas de calidad elevada y relativamente estable**, no dependiente de los defectos en el suministro, calidad y fluctuación de precios de la harina de pescado como única fuente de proteínas (TACON Y JACKSON, 1985).

En principio, las fuentes de proteína susceptibles de ser usadas como alternativas a la harina de pescado en piensos para peces podrían clasificarse de la siguiente manera:

- a) **Proteínas de origen animal**, entre las que se incluirían desperdicios de matadero (carne, huesos, plumas y sangre), ensilados de peces, derivados lácteos y algunas proteínas menos convencionales como las harinas de krill, lombriz y pupa de gusano de seda.
- b) **Proteínas de origen vegetal**, entre las que se incluyen una amplia gama de harinas de semillas y hojas.
- c) **Proteínas de organismos unicelulares**, levaduras, algas, bacterias y hongos.
- d) **Fuentes de nitrógeno no proteico**, como la úrea o el ácido úrico.

Comparadas con la harina de pescado, la mayoría de las fuentes proteicas disponibles presentan alguna deficiencia en un aminoácido específico o un desequilibrio aminoacídico general. Niveles desproporcionados de los mismos pueden dar lugar a antagonismos entre aminoácidos como leucina/isoleucina, arginina/lisina y cistina/metionina, por ejemplo) (TACON y JACKSON, 1985). A esto hay que añadir la presencia de factores endógenos antinutricionales, principalmente en ingredientes de origen vegetal, que limitan el nivel de inclusión de los mismos en piensos para peces y otros animales. Sin embargo, muchos de

estos antinutrientes son termolábiles. Actualmente, los adelantos tecnológicos permiten someter los ingredientes vegetales a tratamientos de procesado con calor seco o calor húmedo que además de facilitar la destrucción de los factores antinutritivos termolábiles, mejoran la digestibilidad de los nutrientes mediante el incremento del área superficial de las partículas (micronización, extrusión y expansión). La Tabla 2 muestra una clasificación de algunas de las sustancias antinutritivas más frecuentes encontradas en ingredientes proteicos, así como los posibles mecanismos de disminución o destrucción de los mismos.

Para maximizar la digestión y absorción de los nutrientes en las dietas para peces y minimizar desechos y costo, es necesario asegurarse de que las enzimas digestivas del pez operan en todo su potencial. Es bien conocido por ejemplo, que existen componentes inhibidores de la tripsina y quimiotripsina en la soja. Esos componentes pueden ser generalmente destruidos mediante tratamientos de la harina con calor antes de su uso, pero el proceso es muy variable y frecuentemente partidas de harina de soja con niveles considerables de inhibidores llegan a los productores de piensos (MITCHELL et al., 1991).

Para la eliminación de tales factores antinutritivos, los fabricantes de piensos cuentan además (VARNISH y CARPENTER, 1975), con una cada vez más amplia variedad de plantas genéticamente mejoradas con las que elaborar sus productos. En este sentido se intenta incrementar el contenido en proteínas (DOLL, 1984; JULIANO, 1985), y en metionina (NIELSEN, 1984; JAYNES et al., 1986) de algunos cereales, pudiéndose conseguir en la actualidad, por ejemplo, semillas de colza con bajo contenido en glucosinolatos o altramuces con bajo nivel de alcaloides (DE LUMEN, 1990). Otra forma de mejorar el valor nutritivo de los vegetales consiste en la suplementación en las dietas con los nutrientes esenciales que pudieran estar en defecto como consecuencia de los antinutrientes (KAUSHIK, 1989).

Tabla 2. Clasificación de algunas sustancias antinutritivas comunmente encontradas en diferentes ingredientes proteicos y posibles medios de destrucción o de limitación de sus efectos perjudiciales (CHUBB 1982 en Kaushik 1989).

PRINCIPALES FACTORES INGREDIENTES MECANISMOS DE DESTRUCCION

Interaccionan con la nutrición proteica

Inhibidores proteásicos	(Tripsina) soja	Calor, autoclave
Hemaglutininas	(Lectinas) soja	Calor, autoclave
Saponinas	Guisantes, alfalfa	Extracc. con alcohol
Polifenoles	(Taninos) sorgo comp. clorogénicos	Suplementación con colina o metionina

Interaccionan con la disponibilidad de los minerales

Acido fitico	Soja	Suplementación
Acido oxálico	Proteína de hojas	Calor
Glucosinolatos	Semillas de colza	Variedades nuevas
Gosipol	Semillas de algodón	Variedades nuevas

Interaccionan con la disponibilidad de las vitaminas

Anti-vitaminas liposolubles

Vit A (lipoxigenasa)	Soja	Calor, autoclave
Vit D	Soja	Calor, autoclave
Vit E (oxidasa)	Judías	Suplementación, autoclave

Anti-vitaminas B

Vit B1 (Tiaminasa)	Carne cruda	Suplementación, calor
Anti-ácido nicotínico	Maíz	
Anti-piridoxina	Harina de semillas	Extracc. acuosa, calor
Anti-vit B12	Soja cruda	Calor
<u>Cianógenos</u>	Mandioca, sorgo	Calor

A continuación se intentará exponer una **visión general de las fuentes proteicas** más usadas **en dietas para peces**, mostrando algunos de los múltiples, y en ocasiones contradictorios, resultados obtenidos con cada una de ellas para las diferentes especies de peces.

El valor de los subproductos animales tales como las **harinas de carne** ha sido revisado por KAUSHIK (1989) y por MOYANO et al. (1989) para diferentes especies de salmónidos; encontrándose que rara vez se incluyen en piensos comerciales a niveles superiores al 20% (MURAI, 1992). Son muchos los trabajos experimentales existentes en la bibliografía que hacen referencia a este tipo de ingredientes. En el caso de la trucha arco iris, *Salmo gairdneri*, se ha visto que la sustitución total de la harina de pescado por harina de carne en dietas no afectaba al crecimiento cuando se utilizó en individuos de 213 g ; sin embargo, en peces de 13 g el aumento de peso con respecto al control de harina de pescado fue significativamente menor (COELHO et al., 1989).

Las **harinas de carne y huesos** están compuestas principalmente por subproductos de matadero no utilizables para el consumo humano, por lo que sus precios son altamente competitivos. El elevado contenido en grasas (8 a 11%) de esta harina ayuda a proteger el contenido en lisina durante el procesado. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de esta harina es su alto contenido en cenizas, normalmente entre un 20 y un 30% en peso seco (HALVER, 1978).

Se ha mostrado también la posibilidad de incluir esta materia prima en dietas prácticas para tilapia, *Oreochromis mossambicus*, (DAVIES et al. 1989, 1990) y para trucha arco iris (DE MÜLDER GROUP TECH. REP., 1988). En el caso de la carpa, *Cyprinus carpio*, el valor nutritivo de la harina de carne y huesos como única fuente de proteínas frente a dietas con harina de pescado, mostró que la harina de carne y huesos produce un menor crecimiento, utilización del alimento y digestibilidad aparente de las proteínas frente a la harina de pescado (PONGMANNERAT y WATANABE, 1991). Por otro lado, una combinación dietaria de harina de carne y huesos y **harina de sangre** sólo dió buenos resultados en dietas para tilapia, *Oreochromis niloticus*, cuando el nivel de sustitución de la proteína de la harina de pescado era menor del 50% (TACON et al., 1984).

Sin embargo han sido realizadas muy pocas investigaciones con harinas de carne y harinas de carne y huesos con peces marinos cultivados, particularmente aquellos asociados con la región mediterránea.

Una combinación dietaria de harina de **subproductos de pollería y harina de plumas hidrolizada** ha dado buenos resultados reemplazando hasta un 75% la proteína de harina de pescado en dietas para truchas (GROPP et al., 1979; HIGHS et al., 1979; TIEWS et al., 1979), y salmón coho (HIGHS et al., 1979).

La **harina de pupa de gusano de seda** como componente en una dieta para alevines de *Clarias batrachus*, resultó en buenos índices de crecimiento y utilización del alimento a niveles de sustitución de hasta un 100% de la harina de pescado (HABIB et al., 1993). Por el contrario, para el pez gato, *Heteropneustes fossilis Bloch*, sólo dió buenos resultados por debajo de un 75% de sustitución (HOSSAIN y JAUNCEY, 1991).

Respecto de las **harinas vegetales**, se observa que este tipo de materias primas están adquiriendo cada vez más importancia en la fabricación de piensos para peces. Las harinas de semillas de leguminosas son alternativas interesantes como fuentes de proteína frente al harina de pescado. De todos los ingredientes proteicos vegetales, **la soja**, *Glycine maxima*, es considerada como la más nutritiva, siendo la más ampliamente utilizada en dietas para peces (LOVELL, 1988). Por ello se presentará un comentario más amplio acerca de sus características y utilización en los piensos.

La soja fue introducida en Europa como semilla oleaginosa a principios de 1900, llegando a convertirse en la principal fuente de aceite vegetal en todo el mundo (AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 1982). La torta de soja, residuo que queda al extraer la mayor parte del aceite de las semillas, es una de las fuentes proteicas más barata para su uso en la alimentación tanto de animales acuáticos como terrestres.

Diferentes productos de soja son usados comunmente como fuente de proteínas en la producción de trucha arco iris (REITNIZ et al., 1978b), siendo también incluidos a bajos niveles en dietas para salmones (RUMSEY y KETOLA, 1975; SPINELLI et al., 1979; KROGDAHL, 1989), y pez gato (LIEBOWITZ, 1981), aunque otros autores han encontrado

un crecimiento y utilización proteica bajos con la inclusión de esta harina en dietas tanto para trucha (SANDHOMHM et al., 1976; DABROWSKI et al., 1989), como para pez gato (WILSON y POE, 1985b).

El elevado contenido proteico da la harina de soja (aproximadamente un 35% en la semilla), unido a su bajo costo la convierten en un importante candidato como sustituto de la harina de pescado (KAUSHIK, 1989 en *Progress in Fish Nutr.*). Sin embargo uno de los principales problemas a la hora de incluir esta harina en alimentos para peces estriba en la posible presencia de elementos antinutritivos en la misma, principalmente inhibidores proteásicos. En la soja han sido encontrados dos tipos de inhibidores tripsicos. Uno de ellos es el inhibidor tripsico (STI) aislado por KUNITZ (1947), que es una proteína globular cristalina de peso molecular 21.500 dalton y 181 aminoácidos residuales (KAKADE et al., 1973; LIENER y KAKADE, 1980) y que constituye aproximadamente el 6% de la proteína total presente en la soja (KAKADE et al., 1973). El otro es el inhibidor Bowmann-Birk (BBI), con un peso molecular de 8.000 dalton (BOWMANN, 1946). Ambos tipos de inhibidores actúan tanto sobre la tripsina como sobre la quimiotripsina (REED, 1975 en *Enzymes in Food Processing*). La enzima digestiva tripsina, sobre la que actúa el STI es importante no sólo por su elevada actividad proteolítica, sino por ser el único activador conocido para otras enzimas (BLACKBURN, 1976 en *Enzyme Estructure and Function*).

El método usual de inactivar los inhibidores tripsicos de la soja es mediante el calentamiento de la harina a una temperatura adecuada. La actividad residual del inhibidor de tripsina varía de acuerdo con el tiempo de tratamiento con calor a que es sometida la harina (SMITH et al., 1980; AMERIO y GATTI, 1983). Por tanto, la determinación de la temperatura y del tiempo de exposición a que es sometida la harina de soja es crítico, puesto que este tratamiento daría lugar no sólo a la desactivación de los inhibidores de la tripsina (MARTINEZ y SERRA, 1989) y otros posibles tóxicos naturales, sino que también originaría la desnaturalización parcial de las proteínas, haciéndolas más digestibles (REINITZ et al., 1978b; VIOLA et al., 1983; DABROWSKI y KOZAK, 1979). Sin embargo, un exceso de calor reduciría la disponibilidad de las proteínas (VARNISH y CARPENTER, 1975; SANDHOLM et al., 1976; AMERIO et al., 1989) o de ciertos aminoácidos esenciales, particularmente la lisina (RIESEN et al., 1947; EVANS y BUTTS, 1951; PLAKAS et al., 1985). Principalmente por esta razón aparecen en la literatura resultados contradictorios referentes a la utilización de la harina de soja una vez ésta ha sido tratada.

De acuerdo con KUNITZ (1947) la combinación del enzima con el inhibidor es instantánea y la cantidad de tripsina inhibida es directamente proporcional a la cantidad de inhibidor usado e independiente de la concentración total y de la pureza de la tripsina. En este sentido, NILSON y FÄNGE (1969) comprobaron que 14 mg de inhibidor de tripsina en la soja por cada 100 mg de proteína inhibe completamente la actividad trípica en el digestivo del pez holocéfalo, *Chimaera monstrosa* L.. WILSON y POE (1985b) mostraron que el 83% de la actividad de los inhibidores trípsicos en la harina de soja debe ser destruída para que esta harina dé buenos resultados de crecimiento en el pez gato. En el caso de la trucha, BERG-LEA et al. (1989) y MITCHELL et al. (1991) mostraron que inclusiones en la ración de inhibidores de tripsina purificados de soja resultaron en un incremento de la excreción de proteínas y lípidos así como en una reducida actividad de tripsina en el intestino. Atendiendo a todo ésto VIOLA et al. (1983), habían mostrado que el calentamiento de la soja a 105°C durante 30-90 min destruía muchos de los inhibidores trípsicos presentes en la misma.

En cuanto a la suplementación de la harina de soja con **aminoácidos cristalinos** con los que corregir las deficiencias de la misma también ha dado resultados contradictorios. ANDREWS y PAGE (1974) no encontraron una mejora significativa del crecimiento del pez gato mediante la suplementación de la harina de soja con aminoácidos puros (metionina, cistina o lisina). En el caso de la trucha arco iris, RUMSEY y KETOLA (1975) encontraron que la suplementación de 5 ó más aminoácidos en piensos para trucha arco iris mejoraba el crecimiento respecto a aquellos que incluían harina de soja sin suplementar. Sin embargo, este efecto beneficioso no se encontró si se adicionaba únicamente los aminoácidos metionina o lisina. Posteriormente, DABROWSKA y WOJNO (1977) encontraron que esta especie puede utilizar esta materia prima, suplementada únicamente con cistina (1%) y triptófano (0.5%), dando resultados casi tan buenos como la harina de pescado. En salmón chinook, sin embargo, KETOLA (1982) encontró que la suplementación de metionina en una dieta con 80% de harina de soja como única fuente de proteínas, con el fin de corregir una posible deficiencia de este aminoácido según los requerimientos establecidos para esta especie (NRC, 1973), no mejoró significativamente los pobres resultados de crecimiento obtenidos con la harina de soja sin suplementar. El pez gato, por otro lado, parece tener un menor potencial para utilizar aminoácidos libres en dietas con harina de soja (ANDREWS y PAGE, 1974; ANDREWS et al., 1977), aunque MURAI et al. (1982) mostraron que efectivamente esta especie es capaz de utilizar metionina sintética añadida a la proteína de soja, lo cual había sido

comprobado en otras especies como la carpa y el salmón (HALVER, 1978 en Fish Feed Technology). Por otra parte, DABROWSKI (1983) encontró que la absorción de aminoácidos en carpas alimentadas con soja resultaba menor que en otras especies de peces tales como la trucha arco iris o el pez gato.

Otros problemas que se han encontrado en la soja son la pobre palatabilidad de la misma (AMERIO et al., 1989; HAJEN et al., 1993) y la baja disponibilidad de ciertos nutrientes, entre ellos los carbohidratos (SAINU, 1988; PONGMANEERAT y WATANABE, 1992), y ciertos minerales (HARTMAN, 1979; SPINELLI et al., 1983; RICHARDSON et al., 1985; HILTON, 1989; GATLIN y PHILLIPS, 1989; HOSSAIN y JAUNCEY, 1991).

Sin embargo, aún con todas estas controversias y características adversas la harina de soja se erige como principal oponente frente a la harina de pescado en la producción de piensos para peces.

Otra fuente proteica alternativa de origen vegetal frecuentemente ensayada es la **harina de gluten de maíz**. Este producto es el residuo seco del maíz obtenido tras la extracción de la mayor parte del almidón y el germen y la separación del salvado por los procesos empleados en las empresas molidoras, o por tratamientos enzimáticos de la endosperma (HALVER, 1978). Se trata, por tanto, de un concentrado proteico de entre 40-60% de proteína, que puede conservar restos de almidón en mayor o menor cantidad. La asimilación de la proteína de gluten de maíz parece ser parcial, debido a que en su composición entran algunas albúminas, que dificultan el ataque enzimático (COLL, 1986). Se usa principalmente en la fabricación de adhesivos, alimentos para diabéticos, como fuente de ácido glutámico (aproximadamente el 24.5 % de la proteína) y en alimentación animal como fuente de proteínas y pigmentos. En el caso de los peces, en la bibliografía se puede encontrar que a nivel general que esta harina puede ser un aceptable sustituto parcial de la harina de pescado en especies como la trucha arco iris (ALLIOT et al., 1979; MOYANO, 1990).

La **harina de altramuces** es otra de las alternativas proteicas a la harina de pescado. El altramuz, *Lupinus spp.*, está considerado como una de las leguminosas de mayor potencial como fuente de proteína vegetal alternativa a la harina de pescado, pues presenta en estado silvestre mayor contenido en proteínas (30-50% según la especie) que prácticamente ninguna

otra planta, adaptándose a terrenos pobres y secos. Por ello se la ha denominado la "nueva soja" de las zonas áridas, y se han incrementado las investigaciones encaminadas a mejorar sus cualidades nutritivas y a fomentar su cultivo en numerosos países de Europa, Sudamérica y Australia. De la región mediterránea proceden una docena de especies silvestres de las que derivan las especies cultivadas: *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius*.

Entre las características a destacar en la composición de las semillas de altramuza son:

- Elevado contenido en grasas, que las hacen ser consideradas como potencialmente oleaginosas. Un problema añadido derivado de la poca estabilidad del aceite que contienen es su facilidad para el enranciamiento.
- Contenido en tocoferol en el aceite relativamente mayor que el del girasol, la soja y el germen de maíz.
- Composición en aminoácidos rica en lisina y pobre en aminoácidos sulfurados, principalmente en metionina.
- Los alcaloides quinilizidínicos como principal componente antinutritivo, los cuales son tóxicos y amargos, pero fácilmente eliminables mediante el lavado de la semilla. No se ha registrado una actividad destacable de los inhibidores de la tripsina en el altramuza, y las hemaglutininas presentan una actividad diez veces menor que en la soja.
- Contenido en hidratos de carbono variable entre un 20 y un 30%, siendo su principal componente la celulosa, que puede superar el 10% en el altramuza de grano pequeño, debido a la elevada proporción de su cubierta con relación al volumen.
- Contienen alrededor de un 2% de ácido fosfórico, además de un 1% aproximado de minerales, y cantidades significativas de vitamina A en la forma de beta-caroteno (LOPEZ y FUENTES, 1991).

Desde el punto de vista económico, una gran ventaja que muestra el altramuza es que no parece precisar ningún tipo de tratamiento con calor con el que mejorar su calidad nutritiva, como mostraron DE LA HIGUERA et al. (1988).

La mayor parte de los pocos trabajos llevados a cabo con esta harina en piensos para peces, han sido realizados con trucha arco iris (DE LA HIGUERA et al., 1988; HUGHES, 1988; KAUSHIK, 1989; GOMES y KAUSHIK, 1989a; MOYANO et al., 1990, 1992), y con carpa y tilapia (VIOLA et al., 1989).

En cuanto a la posibilidad de inclusión de la **harina de semillas de colza** como fuente proteica en dietas para peces, ésta también ha sido estudiada en diferentes trabajos (YURKOWSKI et al., 1978; HARDY y SULLIVAN, 1983). En dietas experimentales para carpa común, DABROWSKI y KOZLOWSKA (1981) sustituyeron satisfactoriamente hasta un 50% de la harina de pescado dietario por harina tostada de semillas de colza. Por el contrario, en dietas prácticas para tilapia, el contenido en glucosinolatos es el principal factor limitante a la hora de incluir harina de semillas de colza, no siendo recomendados niveles superiores a un 15% del total de la dieta (DAVIES et al., 1990a).

También las **semillas de girasol** han dado buenos resultados de crecimiento, utilización del alimento y digestibilidad de las proteínas en truchas arco iris de 40 g de peso medio inicial alimentadas con niveles de sustitución de hasta un 40% de la proteína de pescado. Sin embargo, a estos niveles de sustitución hay que tener en cuenta la posible deficiencia de ciertos aminoácidos, especialmente la metionina (MARTINEZ, 1986), que puede originar diferencias con respecto a un pienso control a base de harina de pescado (CARDENETE et al., 1991). La tilapia, por el contrario, tolera elevados niveles de inclusión de harina de semillas de girasol en la ración sin que exista retraso en el crecimiento (JACKSON et al., 1982).

Otras fuentes proteicas de origen vegetal utilizadas en piensos para peces, aunque menos frecuentemente, son **la harina de algodón, la harina de canola, la harina de guisantes y los concentrados proteicos de hojas**.

En la harina de semillas de algodón cabe destacar la presencia, a diferentes niveles dependiendo del procesado a que es sometida la semilla, del gosipol como principal factor antinutritivo. Este factor que es tóxico para muchos animales (LOVELL, 1989), en peces se ha visto que afecta de diferente manera a las distintas especies. Así tenemos que HERMAN (1970) encontró que un 0.03% de gosipol en el pienso era tóxico para la trucha arco iris, mientras que el bagre se ha visto que puede tolerar hasta un 0.09 % de este producto en el pienso (DORSA et al., 1982).

En el caso de los guisantes tecnológicamente bien tratados, la digestibilidad aparente de las proteínas y de los carbohidratos fue bastante alta en trucha arco iris, 90% y 96%

respectivamente, pudiendo ser incluidos hasta niveles del 25% en el caso de ser semillas extrusionadas (DEGODET, 1994).

Otro tipo de fuentes proteicas vegetales serían los **concentrados de proteínas vegetales**, usualmente concentrados de proteínas de patatas (PPC) y de proteínas de hojas (LPC), que son precipitados a partir de una suspensión acuosa mediante procesos de coagulación térmica. El concentrado de proteínas de patata contiene un factor antinutritivo estable al tratamiento térmico (glucoalcaloides) que impiden su uso a elevado nivel en las dietas. La utilización de este tipo de concentrados proteicos en alimentos para peces va a depender en gran medida del grado de sofisticación y costo del método de procesamiento empleado. Normalmente todos los métodos que permiten la obtención de estos concentrados proteicos tienen unos costos muy elevados, no siendo los productos finales competitivos con otras fuentes proteicas convencionales (TACON et al., 1985).

En el caso de los **concentrados proteicos de hojas** no existen muchos trabajos que hagan referencia a su inclusión en piensos para peces. Para las hojas de alfalfa se ha comprobado que en alimentos para alevines de tilapia, pueden ser incluidos a niveles de hasta un 35% de la proteína dietaria, en alimentos que contienen un 40% de proteína; niveles de inclusión superiores produjeron disminución del crecimiento (OLVERA-NOVOA et al., 1990).

Los desechos procesados principalmente de subproductos de origen animal (**ensilados**) suponen otro tipo de fuente alternativa de proteína de reciente utilización en dietas para peces, bien usándolos directamente o usando sus nutrientes una vez extraídos. Sin embargo existe una amplia lista de dificultades asociadas con la utilización de este tipo de materias primas (TACON, 1979; SPINELLI, 1980), entre ellas una creciente demanda de legislaciones más severas para este tipo de productos, junto con su elevado costo frente a otras fuentes más convencionales.

Una nueva generación de ingredientes alimenticios no convencionales serán las **proteínas unicelulares** (SCP). Dentro de este grupo se incluirían un amplio rango de algas, hongos (incluidos levaduras), y bacterias, las cuales son producidas por procesos de fermentación para su uso en alimentación animal. Este tipo de materias primas tienen una serie de ventajas con respecto a los ingredientes convencionales: elevada concentración proteica, cortos

tiempos de regeneración, reducido espacio para su cultivo, y composición nutricional controlable mediante manipulación genética. Entre sus desventajas destaca el hecho de que una significativa proporción del N que las constituyen aparece en forma de ácidos nucleicos, nucleótidos y hexosaminas poliméricas, algunas de las cuales pueden ser perjudiciales para el pez si se suministran a elevadas concentraciones (SANCHEZ MUNIZ et al., 1978; TACON y COOKE, 1980).

El uso de **fuentes de nitrógeno no-proteico** tales como la urea o el citrato de amonio en dietas para peces ha dado resultados contradictorios incluso en una misma especie. Peces como el salmón rey (DE LONG et al., 1959), y la carpa común (DABROWSKY, 1979; HEPHER et al., 1979) no parecen utilizar de manera apreciable fuentes de nitrógeno no proteico, al contrario de lo que ocurre con la lisa, *Mugil sp.*, (LERAY, 1971). La mayoría de los autores ponen de relieve la participación de la flora bacteriana intestinal en el empleo del nitrógeno no proteico, de tal forma que las bacterias probablemente lo absorben para la síntesis de su propia proteína corporal, que es utilizada posteriormente por el pez (HEPHER, 1988).

Por último, y siguiendo dentro del contexto de las fuentes alternativas de proteínas a la harina de pescado, cabría hacer referencia al posible uso de **aminoácidos en forma cristalina** con los que suplir las posibles deficiencias ocasionadas por la utilización de esas fuentes alternativas. En este sentido, existen controversias en cuanto a la eficacia en la utilización de aminoácidos libres en dietas para peces. Las diferencias existentes entre la tasa de absorción de los aminoácidos sintéticos y aquellas derivadas de la digestión de proteínas dietarias en trucha arco iris (COWEY y WALTON, 1988), sugieren que una mezcla de proteínas diseñada para alcanzar un determinado perfil de aminoácidos da mejores resultados que el aporte de aminoácidos sintéticos. El efecto beneficioso de suplementar con simples o múltiples aminoácidos en forma cristalina las dietas con carencia de ellos ha sido demostrado en numerosas especies de peces, incluyendo la trucha arco iris (NOSE, 1971, 1974; RUMSEY y KETOLA, 1975; DABROWSKA y WOJNO, 1977; TIEWS et al., 1979; MAHNKEN et al., 1980; MURAI et al., 1987), el salmón atlántico (BERGTROM, 1979; KETOLA, 1982), el salmón coho (SPINELLI et al., 1979; MAHNKEN et al., 1980), el pez gato (MURAI et al., 1982; ROBINSON et al., 1980); y la carpa común (VIOLA et al., 1982; MURAI et al., 1982; KAUSHIK y DABROWSKI, 1983).

Por el contrario, existen también diversas experiencias en las que la suplementación con aminoácidos no supuso mejora alguna en crecimiento y utilización del alimento. En este sentido, EL-SAYED (1990) encontró que la adición de lisina cristalina en dietas para tilapia conteniendo harina de semillas de algodón, no mejoró el crecimiento comparando con dietas en las que no se añadió lisina. MORALES et al. (1993), observaron que la complementación de las dietas con aminoácidos libres hasta alcanzar los niveles necesarios para la trucha arco iris en las que parte de la harina de pescado fue sustituida por harinas de girasol y gluten de maíz, no mejoraba significativamente la utilización de la proteína y, por consiguiente, tampoco tuvo repercusión en el valor real de la energía metabolizable.

1.6. UTILIZACION METABOLICA DE LAS PROTEINAS; IMPACTO AMBIENTAL DE LA ACUICULTURA.

La eutrofización del mar es un serio problema en la actualidad. El impacto de las granjas acuícolas debe ser discutido junto con los impactos producidos por otras actividades productivas (FOLKE y KAUTSKY, 1992). El impacto medioambiental de las empresas acuícolas está en función principalmente de la composición del alimento, coeficientes alimenticios y procesos metabólicos de los animales. En este sentido, los productos de la excreción y pérdidas de alimento no ingerido pueden originar cambios en el ecosistema. Sin embargo en la acuicultura nórdica por ejemplo, en la que entre 1974 y 1989 se ha experimentado un incremento de la producción de 12 veces, los incrementos de las descargas de nitrógeno sólo se han multiplicado por 7 y los de fósforo por 6. Según estos datos, las descargas estimadas de nutrientes para 1994 resultarán en un incremento pequeño comparado con el incremento en la producción. Mejoras en la composición del alimento y en las técnicas de alimentación son los principales motivos de estos resultados (ENELL, 1994).

La retención neta de N por el pez es aproximadamente del 40%. Valores más altos han sido obtenidos para dietas de elevada relación proteína/energía usadas corrientemente en la producción de salmón atlántico (CHO, 1991). Este valor del 40% 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 (órgano del cuerpo del pez donde se produce la máxima tasa de catabolismo de aminoácidos), después de que ellos son 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.

Los componentes nitrogenados excretados en las heces consisten, por una parte, en **nitrógeno no absorbido** o no digerido del alimento y, por otra, en una fracción originada en el cuerpo compuesta por residuos de la bilis y otros jugos digestivos, células epiteliales desprendidas del tracto alimentario al pasar el alimento a través de él y residuos bacterianos. En los peces, una cierta cantidad de proteínas corporales están continuamente degradándose y reutilizándose, dando lugar a una excreción de nitrógeno no relacionada con el alimento ingerido. Este tipo de excreción, conocida como **excreción endógena**, como distinción del nitrógeno no digerido del alimento, se basa en la presencia de componentes nitrogenados en las heces de peces alimentados con dietas libres de nitrógeno y en los teleósteos se sitúa entre 100 y 200 mgN/kg/h (KAUSHIK, 1990). En consecuencia habrá que diferenciar entre **digestibilidad real y digestibilidad aparente de las proteínas**, según se considere o no respectivamente la presencia de este N fecal endógeno. Mientras que la cantidad de nitrógeno del no digerido está determinada por la digestibilidad del nitrógeno en el alimento, la tasa de excreción del nitrógeno metabólico está determinada en parte por la cantidad total de materia seca consumida y la digestibilidad de ésta, así como por el tamaño del pez, entre otros factores. Por otro lado, el incremento de la excreción de nitrógeno metabólico con el aumento del alimento ingerido es fácil de entender teniendo en cuenta que a mayor alimento ingerido, mayor será la secreción de jugos digestivos (WATANABE, 1988).

La toxicidad de los componentes nitrogenados excretados por los peces constituye uno de los principales factores limitantes en acuicultura intensiva (COLT y ARMSTRONG, 1981). El amonio se encuentra presente en el agua tanto en la forma ionizada (NH_4^+) como no ionizada (NH_3), siendo el equilibrio del amonio en el agua fuertemente dependiente del pH del medio. La toxicidad del amonio para los organismos acuáticos es atribuida principalmente a la forma no ionizada (THURSTON et al., 1981).

El amoniaco es, con mucho, el principal producto final del catabolismo nitrogenado en teleósteos, representando usualmente más del 70% del nitrógeno excretado, aunque en ocasiones puede llegar incluso hasta el 90% (VAN WAARDE, 1983; BEAMISH y THOMAS, 1984; WALTON, 1987; KAUSHIK y COWEY, 1991). Del resto de la fracción la mayor parte la constituye la urea, aunque también se excretan otros compuestos nitrogenados tales como ácido úrico, aminoácidos, trimetilamina, óxido de trimetilamina, creatina y creatinina (FORSTER y GOLDSTEIN, 1969).

En el caso de la dorada, PORTER et al. (1986, 1987), encontraron que expresado como porcentaje del alimento consumido, la excreción de N se realizó de la siguiente manera: 30% como amonio disuelto (DA) N-NH_4^+ , 30% como N orgánico disuelto (DON), 30% en crecimiento y 10% en heces, siendo la urea no detectable. Trabajos posteriores (KROM y NEORI, 1989), corroboran estos resultados.

Han sido propuestos tres mecanismos principales por los que se llevaría a cabo la excreción branquial de amoniaco en los peces (EVANS, 1984): difusión pasiva de NH_3 (no ionizado), intercambio iónico de NH_4^+ por Na^+ , y difusión pasiva de NH_4^+ . El amoniaco se disuelve fácilmente en el agua, experimentando el 99% de él disociación iónica cuando el pH del medio y el sanguíneo son casi neutros (HEPHER, 1988).

Debido a que el amonio es el principal producto de la excreción soluble originado por el metabolismo de las proteínas, representando casi el 60% del N total ingerido, en muchas especies de peces una gran parte de la literatura referida a la excreción de N hace referencia exclusivamente a esta porción de las pérdidas metabólicas. De acuerdo con SOLOMON y BRADFIELD (1972), la consideración de que todo el nitrógeno es excretado como amonio podría dar un error de menos de un 0.5%. Sin embargo, a partir de estudios de balances de N parece que esta consideración no es válida y que una significativa información se pierde midiendo sólo amonio y/o urea (KAUSHIK, 1980; KAUSHIK y DABROWSKI, 1983).

En cuanto al N no ingerido del alimento o excreción particulada, muchos piensos de los usados en la alimentación de salmónidos dan lugar a unas liberaciones al medio de alrededor del 10% para el N y al menos una tercera parte del P, dependiendo del tipo de ingredientes usados en la fabricación del pienso.

Según COWEY (1994), los peces tienen poca capacidad metabólica para regular la actividad de los enzimas que desaminan aminoácidos, por lo tanto el alcance de reducir la excreción de N principalmente como NH_3 , mediante medios dietarios es muy limitado. Sin embargo, WATANABE et al. (1983) indicaron que las excreciones branquiales y urinarias de nitrógeno se ven ampliamente influenciadas por la **calidad de la proteína dietaria**, el nivel de alimento ingerido y la temperatura del agua en especies como la trucha arco iris.

1.7. OBJETIVOS.

Con la finalidad de buscar fuentes proteicas potencialmente alternativas a la harina de pescado en dietas para engorde de doradas, se han establecido los siguientes objetivos:

- 1.- Selección de posibles fuentes alternativas.
- 2.- Determinación de los efectos de las dietas que incluyen las fuentes previamente seleccionadas sobre el crecimiento y posibles alteraciones histológicas en los peces.
- 3.- Determinación de la utilización nutritiva de dietas con cada una de las fuentes seleccionadas a distintos niveles de inclusión.
- 4.- Determinación de la utilización digestiva de dietas con cada una de las fuentes seleccionadas a distintos niveles de inclusión.
- 5.- Determinación de la utilización metabólica de dietas con cada una de las fuentes seleccionadas a distintos niveles de inclusión.
- 6.- Recomendación de las fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado a utilizar en dietas de engorde para dorada, indicando los niveles adecuados de sustitución de cada uno de ellos.

2. MATERIAL Y METODOS.

2.1. INGREDIENTES.

2.1.1. Selección.

Por razones económicas y prácticas las dietas deben contener fuentes de proteína localmente disponibles, preferiblemente aquellas que no sean apropiadas para el consumo humano directo (JACKSON et al., 1982). Además de una alta disponibilidad a lo largo del año, los ingredientes seleccionados deben cumplir las siguientes condiciones:

- Contenido proteico medio o alto.
- Perfil de aminoácidos adecuado (sobre todo de los aminoácidos esenciales).
- Ausencia de factores antinutritivos.
- Digestibilidad alta.
- Precio relativamente bajo y lo más estable posible.

A la hora de seleccionar los ingredientes a ensayar en los experimentos llevados a cabo en este trabajo, se intentó en principio recabar información sobre la posibilidad de utilizar aquellos que fuesen producidos en la islas. En este sentido, el único producto encontrado fue el maíz, con una producción aproximada de unas 140 Tm/año, siendo su uso destinado casi en exclusiva al consumo humano (Dpto. Estadística, Consejería de Agricultura y Pesca del Gobierno de Canarias).

El siguiente paso fue buscar entre los productos cuya entrada a los puertos canarios fuese representativa. Para ello se partió de los datos de entrada al Puerto de la Luz y de Las Palmas en los años 88/89 (Tabla 3).

Puesto que el maíz y el trigo blando, productos de máxima importación a nivel local, se destinan al consumo humano directo una vez molidos, se optó por seleccionar otros ingredientes, de origen vegetal o animal, en función de sus características composicionales (NRC, 1983; HUGGES, 1988) y de su utilización como ingredientes proteicos en dietas para otras especies de peces. De esta forma fueron elegidos la HARINA DE SOJA, HARINA DE

ALTRAMUZ, HARINA DE GLUTEN DE MAIZ Y HARINA DE CARNE Y HUESOS, como fuentes alternativas de proteínas a la proteína de pescado a ensayar en todos los experimentos realizados en este trabajo.

Tabla 3. Ingredientes proteicos de máxima entrada al Puerto de La Luz y de Las Palmas en los años 1988/89 (Información cedida por S.E.N.P.A., (Delegación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)).

INGREDIENTES	TM/AÑO	PTS/KG
AÑO 1988		
Maíz	84.783	20.490
Trigo blando	73.769	17.590
Harina de soja	4.803	32.670
Harina de trigo	4.760	N.D.
Cebada	3.884	18.080
AÑO 1989		
Maíz	83.664	23.180
Trigo blando	58.569	22.630
Harina de soja	6.722	44.460
Harina de trigo	4.904	N.D.
Sémola de maíz	2.084	19.750
Cebada	1.446	23.000

N.D.- Datos no disponibles.

La Tablas 4 y 5 muestran el cómputo químico calculado para el primer aminoácido limitante de cada una de las materias primas seleccionadas, y la composición general de las mismas respectivamente.

Tabla 4. Cómputo químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de las materias primas a utilizar en los diferentes experimentos, frente a las necesidades en AAE para dorada.

	Harina de pescado	Harina de soja	Harina de altramuz	Gluten de maíz	Harina de carne y huesos
Cómputo químico	67.75	75.47	41.25	33.86	64.70
% deficiencia	32.25	24.53	58.75	66.14	35.30
Primer AAE limitante	Ile	Met	Met	Lys	Met

Tabla 5. Composición general (% peso seco) de los ingredientes proteicos seleccionados con los que se realizarán los distintos experimentos de este trabajo.

	Int. Feed	Humeda	Prot.	Líp.	Fibra	Ceniza	Ca	P	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
Harina de soja ^a	5-04-600	10.0	47.7	5.3	6.6	6.7	0.29	0.68	3.41	1.26	2.92	4.02	3.10	0.72	2.45	1.92	0.68	2.53
Harina de altramuz ^b	5-20-293 ^d	10.0	40.0	14.0	-	3.0	-	-	4.57	0.78	1.56	2.56	1.78	0.33	1.22	1.34	1.00	1.45
Harina de gluten de maíz ^a	5-28-241	9.0	46.8	2.4	4.8	3.4	0.16	0.50	1.53	1.06	2.46	7.92	0.87	1.14	3.05	1.56	0.23	2.40
Harina de carne y huesos ^a	5-00-388	7.0	54.1	10.4	2.4	31.5	10.30	5.10	3.75	1.04	1.76	3.29	3.11	0.70	1.83	1.77	0.32	2.63
Harina de pescado ^c	5-02-000	8.0	78.3	9.2	0.7	11.4	2.40	1.82	4.11	2.05	2.30	4.80	4.65	1.65	2.37	3.06	0.83	2.37

(a) NRC (1983).

(b) HUGHES (1988).

(c) NRC (1983) excepto los aminoácidos, que fueron determinados analíticamente (Lab. Agroalimentario, Subdirección General de Calidad Agroalimentaria, Madrid).

(d) VIOLA et al. (1989).

En principio se partió como primer ingrediente a ensayar de la harina de soja, por ser una harina de uso generalizado en la producción comercial de piensos para peces. La segunda fuente proteica seleccionada fue la harina de altramuces, la cual, como se reflejó en el Apdo. 1.5., aunque es una harina cuya utilización en dietas para peces es relativamente reciente, ha dado muy buenos resultados en especies como la trucha. Por último, las dos harinas restantes (gluten y carne y huesos) fueron elegidas en función tanto de su composición, como de la revisión de los resultados obtenidos con diferentes especies de peces.

2.1.2. TRATAMIENTOS Y CONTROLES DE CALIDAD.

Dos de las cuatro fuentes proteicas alternativas seleccionadas fueron tratadas antes de ser incluídas en las dietas: la soja y el altramuz.

La soja a utilizar fue torta de soja groseramente particulada, por lo que se molió en un triturador Cyclotec de la marca Tecator (Höganäs, Swedden, 1093 Sample Mill), haciendola pasar a través de una rejilla de 0.5 mm de luz de malla, con el fin de mejorar la disponibilidad de sus nutrientes.

En el caso del altramuz se partió de semillas secas de la especie *Lupinus angustifolius*, caracterizadas por un elevado contenido en alcaloides. Por ello en primer lugar se trató de eliminar esos antinutrientes, para lo cual las semillas se hidrataron en agua dulce durante un período de 24 h, renovando el agua en varias ocasiones. Posteriormente se secaron durante 12 h a 40°C y finalmente se molieron las semillas en un molino de agua, debido a la dificultad que conlleva la trituración de los granos secos obtenidos, tanto por su dureza como el alto contenido en lípidos de los mismos.

Se consideró apropiado para la harina de soja someterla a un control de su calidad nutritiva ya que, como se ha visto en apartados anteriores, ésta puede variar de manera considerable según el tratamiento al que ha sido sometida durante el procesado para la extracción del aceite. Los análisis que se utilizaron para ello fueron la determinación de su composición en inhibidores de la tripsina y la solubilidad de las proteínas en KOH según los métodos especificados en los Apdos. 2.5.9. y 2.5.10., respectivamente.

2.2. PREPARACION DE LAS DIETAS.

2.2.1. Formulación.

Todos los ingredientes fueron obtenidos a nivel local, excepto el gluten de maíz que fue proporcionado por la empresa CAMPOEBRO INDUSTRIAL, S.A.

Una vez analizada la composición de las materias primas a utilizar, se formularon las dietas en base a los resultados obtenidos. Los perfiles de aminoácidos dietarios fueron calculados en función de los datos contenidos en la Tabla 5 y comparados con la composición de aminoácidos esenciales en alevines de doradas (LUQUET y SABAUT, 1974; VERGARA, 1992), tomándo este último como referencia de las necesidades de aminoácidos de esta especie, con el objeto de determinar posibles aminoácidos limitantes en las dietas a ensayar (COWEY y TACON, 1983; OGATA et al., 1983; COWEY y LUQUET, 1983; WILSON y POE, 1985c). En ningún caso se consideró necesario suplementar con aminoácidos cristalinos, máxime cuando la utilización de los mismos por los peces según la revisión previa es muy variable.

Todos los piensos fueron formulados para ser aproximadamente isocalóricos en energía bruta y similares en el contenido en proteínas y lípidos.

Las Tablas 6 y 7 muestran las mezclas de vitaminas y minerales usadas en los distintos ensayos.

Se usó una dieta control con harina de pescado como única fuente proteica en todos los ensayos, como base de comparación de resultados frente a los tratamientos experimentales.

Tabla 6. Mezclas de vitaminas y minerales usadas en la elaboración de los piensos ensayados en los experimentos 1 y 4.

Mezcla de vitaminas (mg/kg o U.I./kg de dieta)		Mezcla de minerales (gr/kg de dieta)	
Tiamina (B ₁)	37.0	Mn	9.3
Riboflavina (B ₂)	48.0	Cu	0.9
Piridoxina (B ₆)	20.0	Co	2.2
Pantotenato cálcico	74.0	I	2.0
Acido nicotínico	300.0	Zn	44.0
Biotina (H)	0.5		
Acido fólico	10.0		
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.1		
Cloruro de colina	1700.0		
Mio-inositol	337.0		
Acido ascórbico (C)	240.0		
α -tocoferol (E)	300.0		
Menadiona (K ₃)	110.0		
Colecalciferol (D ₃)*	2000.0		
Retinol acetato (A)*	5000.0		
Etoxiquina	130.0		

* Expresado en U.I.

Tabla 7. Mezclas de vitaminas y minerales usadas en la elaboración de los piensos ensayados en todos los experimentos excepto en el 1 y 4.

Mezcla de vitaminas (mg/kg o U.I./kg de dieta)		Mezcla de minerales (gr/kg de dieta)	
Tiamina (B ₁)	40.0	(H ₂ PO ₄) ₂ Ca	1.605
Riboflavina (B ₂)	50.0	CaCO ₃	4.000
Piridoxina (B ₆)	40.0	FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.500
Pantotenato cálcico	117.0	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.605
Acido nicotínico	200.0	K ₂ HPO ₄	2.800
Biotina (H)	1.0	Na ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.000
Acido fólico	10.0	Al ₂ (SO ₄) ₃ · 6H ₂ O	0.020
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.5	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.240
Cloruro de colina	2700.0	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.120
Mio-inositol	600.0	MnSO ₄ · H ₂ O	0.080
Acido ascórbico (C)	1000.0	KI	0.020
α-tocoferol (E)	250.0	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.080
Menadiona (K ₃)	20.0		
Colecalciferol (D ₃)*	2000.0		
Retinol acetato (A)*	5000.0		
Etoxiquina	100.0		

* Expresado en U.I.

2.2.2. Elaboración.

En la elaboración de las dietas se comenzó por mezclar en primer lugar todos los ingredientes secos (harinas, fuentes de carbohidratos, minerales, vitaminas hidrosolubles y aglutinantes) durante unos 20 min., en una mezcladora de la marca Danamix (Mod. BM 330), añadiendo a continuación el aceite o los aceites con las vitaminas liposolubles y el etoxiquin, seguido de la cantidad de agua suficiente (en la que era disuelta la colina) como para permitir el granulado de la mezcla resultante en una peletizadora MOBBA de 2 HP (Mod. 8.3), a través de una matriz para 3 mm de diámetro de gránulos. Los granos así obtenidos se secaron a una temperatura inferior a los 40°C durante unas 12 h y se guardaron a -20°C, desde donde una vez por semana se iba sacando (y conservando a 4°C), la cantidad necesaria con la que ir alimentando a los peces. Se guardaron también muestras secas de cada uno de los piensos a -20°C para análisis bioquímicos.

2.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES Y TOMA DE MUESTRAS.

Todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo fueron realizados en la planta experimental de cultivos marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria.

En los diferentes ensayos se emplearon doradas procedentes de una empresa local, ADSA S.A., situada a 28 km del centro de experimentación. El peso medio inicial de los peces a utilizar en cada uno de los experimentos estuvo en torno a 40-50 g, para lo que se realizó una preselección de los animales en la propia planta de procedencia. Una vez en el laboratorio, los peces fueron aclimatados en tanques de 1 m³, con una dieta control durante al menos una semana, antes de ser pesados y distribuidos en los tanques de experimentación.

Se contó con dos tipos de tanques de cultivo según el objetivo del experimento, siendo ambos diseñados por el equipo de investigación, y contruidos a nivel local. En los ensayos de engorde se utilizaron tanques cilíndricos de fondo plano de fibra de vidrio de 100 l de capacidad cada uno (Fig.2).

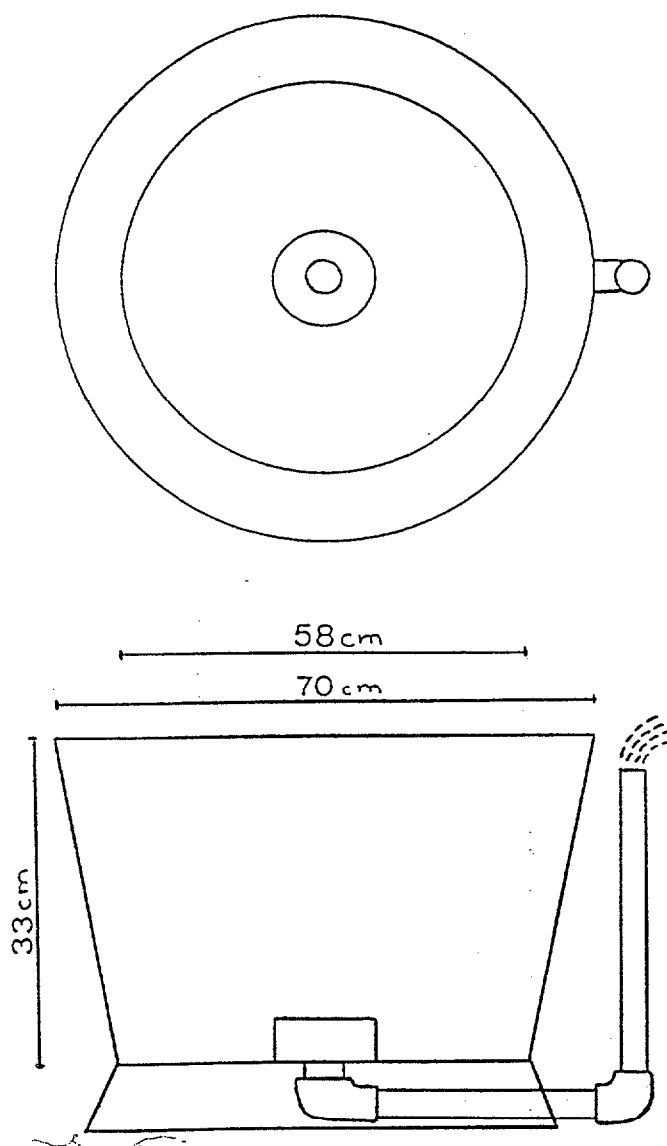


Fig. 2. Sistema de tanques utilizado en los experimentos de evaluación nutritiva del alimento.

En los experimentos de utilización digestiva del alimento, los tanques utilizados se diseñaron a partir del Sistema Guelph (CYAQ-2) propuesto por CHO et al. (1975, 1982), Fig. 3, en el que se aplicaron una serie de modificaciones (Figs. 4), con el fin de facilitar el manejo de las heces y minimizar las pérdidas de nutrientes de las mismas. En este caso los depósitos tenían forma troncocónica, con 125 l de capacidad cada uno y desagües centrales hacia una columna de decantación según se especifica en la Fig. 4. La Fig. 5 muestra con más detalle este sistema de tanques que también fue utilizado en los ensayos de determinación de excreción de amonio.

El suministro de agua a los tanques se realizó de forma continuada a partir de agua de mar natural procedente de un tanque de sedimentación de 27 m³ situado en el exterior de la planta de cultivo. En el caso de los tanques circulares el agua llegaba a los mismos por simple gravedad, mientras que los troncocónicos, por su especial ubicación, obligaron a la colocación de un sistema de bombeo directo desde el mencionado depósito de sedimentación.

Los tratamientos fueron ensayados por triplicado, y la alimentación se realizó "ad libitum" seis días por semana. Diariamente se anotaron las mortalidades, en su caso, y los gramos de pienso consumidos por los peces de cada tanque. Dos veces por semana se midieron temperatura, concentración de oxígeno disuelto y pH del agua de cada tanque.

2.3.1. Condiciones experimentales en ensayos de crecimiento y utilización nutritiva del alimento.

Los experimentos de este tipo se prolongaron hasta la duplicación del peso de los animales con respecto al peso inicial, siendo para ello pesados individualmente cada dos semanas. Antes de cada control de peso los peces permanecieron en ayuno durante 24 horas.

Al inicio de cada experimento se escogieron al azar 13 peces del tanque de aclimatación, los cuales una vez sacrificados con sobredosis de anestésico (MS-222, Lab. Sandoz, Switzerland), sirvieron como muestra inicial. De ellos, 10 fueron pesados y conservados a -20°C hasta el momento de su análisis, siendo los 3 restantes usados para la toma de muestras para estudios histológicos. El resto de los peces fueron anestesiados normalmente, (0.7 ml anestésico/l), pesados y distribuidos al azar en los tanques experimentales.

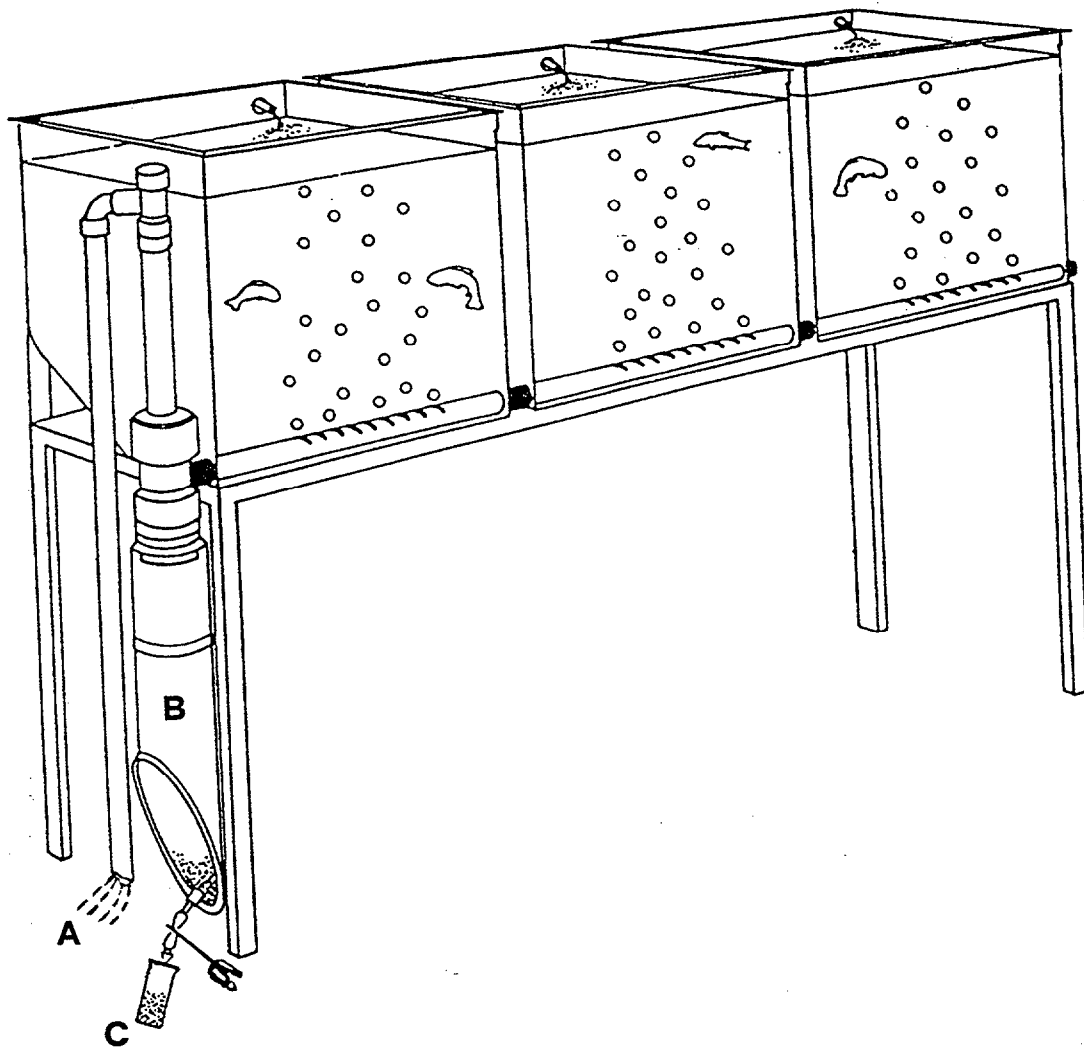


Fig. 3. Sistema de recolección de heces (Guelph System) diseñado por CHO et al., (1975, 1982): A) Desagüe; B) Columna de decantación; C) Vaso recolector.

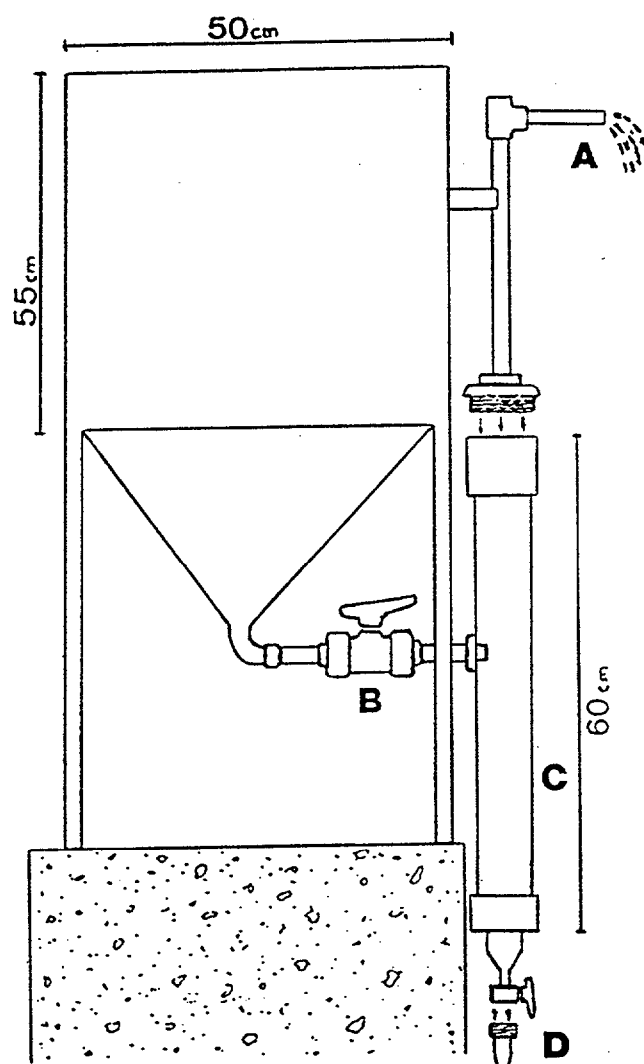


Fig. 4. Sistema de recolección de heces: A) Desagüe; B) Llave; C) Columna de decantación; D) Tubo de centrifugado.



Fig. 5. Detalle del sistema de tanques utilizados en todos los experimentos de digestibilidad.

Al finalizar los experimentos se guardaron 5 peces por tanque para análisis bioquímicos de las carcasas o músculos, 3 digestivos por tanque para análisis enzimáticos en su caso, y 3 hígados por tanque para estudios bioquímicos y/o histológicos.

2.3.2. Condiciones experimentales en ensayos de utilización digestiva del alimento.

En este caso los experimentos se prolongaron sólo lo suficiente para permitir la recogida de las heces necesarias con las que poder llevar a cabo los análisis bioquímicos de las mismas.

Los peces fueron aclimatados a los tanques experimentales y alimentados con sus dietas correspondientes durante una semana, antes de comenzar con la recogida de heces.

Unicamente se tomaron datos de peso inicial y final de los peces, así como de las mortalidades diarias observadas y del alimento consumido por los animales de cada uno de los tanques.

2.3.2.1. Recolección y tratamiento de heces.

El método de recolección de heces seguido es similar al descrito por CHO, COWEY y WATANABE, 1985 en *Finfish Nutrition in Asia*, y puede ser desglosado en los siguientes pasos:

- 1º- Alimentación habitual de los peces a lo largo del día, procurando que no hayan pérdidas de alimento.
- 2º- Cierre de las entradas de aire, después de la última toma de alimento, durante unos 10-15 min para facilitar la deposición de posibles restos de comida y heces en el fondo de los tanques .
- 3º- Limpieza de los tanques mediante vaciado cuidadoso de las dos terceras partes del agua de los mismos a través de las columnas de decantación.
- 4º- Reposición rápida de los niveles de agua habituales y apertura de las llaves de aire.
- 5º- Colocación de los tubos para recogida de heces que serán retirados la mañana siguiente.

Este proceso se debe realizar cada día aproximadamente a la misma hora, siendo las heces recogidas una muestra representativa de las excreciones a lo largo de las 24 h del día. Una vez recogidas las heces, se centrifugan (centrífuga Sigma, Milwaukee, USA, 3K20) durante 20 min a 10000 rpm, se deshecha el sobrenadante y se pesan, liofilizan (liofilizador Heto, Birkerød, Denmark, CD8) y conservan a -80°C hasta el momento de su análisis.

Antes de ser analizadas, las heces ya secas son primero tamizadas con el fin de liberarlas de posibles escamas. Posteriormente son molidas en un triturador Cyclotec de la marca Tecator (Höganäs, Sweden, 1093 Sample Mill), al que se le adapta una rejilla de 0.5 mm de luz de malla.

2.3.3. Condiciones experimentales en ensayos de excreción de amonio.

Los tanques utilizados para la realización de estos experimentos fueron los troncocónicos mostrados en la Fig. 4. La rutina de toma de muestras consistió en alimentar a los peces con sus respectivas dietas experimentales a primera hora de la mañana, limpiando a continuación los tanques cuidadosamente con la ayuda del vaciado de la tres cuartas partes de los mismos, volviéndolos a llenar lo más rápidamente posible. Una vez hecho esto se procede a cerrar las entradas de agua de cada uno de los tanques, vigilando cada hora la concentración de oxígeno y el comportamiento de los peces en el interior de los mismos. Cada dos horas a partir de la hora de alimentación se mide el pH y se toman muestras de agua de cada uno de los tanques en recipientes de plástico oscuros llenándolos en toda su capacidad, los cuales se guardan inmediatamente a 4°C hasta el momento de su análisis.

2.4. PARAMETROS BIOLOGICOS UTILIZADOS.

2.4.1. Crecimiento.

Una vez cuantificada la ingesta total de cada dieta, se valora el crecimiento en peso de cada lote experimental, como primera medida para estudiar los índices de eficacia del

alimento. El crecimiento se puede expresar en términos absolutos, o bien como porcentaje respecto del peso inicial.

$$\text{Crecimiento (\% sobre el peso inicial)} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

2.4.2. Eficacia bruta del alimento.

La eficacia del alimento (FE) se define como la relación entre el peso corporal ganado (g) por alimento seco consumido (g). La FE varía con el nivel de alimentación y el tamaño de los peces.

$$\text{FE} = \frac{\text{Incremento de peso (g)}}{\text{Alimento ingerido (g)}}$$

2.4.3. Utilización de la proteína.

2.4.3.1. Coeficiente de eficacia proteica.

El coeficiente de eficacia proteica (PER) se define como la relación entre el peso corporal ganado (g) por proteína ingerida (g) y representa una medida de la habilidad del pez para utilizar la proteína dietaria (OSBORNE et al., 1919). Este índice es el método más utilizado para determinar la calidad de la proteína.

$$\text{PER} = \frac{\text{Incremento de peso (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

2.4.3.2. Valor productivo de la proteína (%).

El valor productivo de la proteína (PPV) se define como la relación porcentual entre la

ganancia de nitrógeno corporal y nitrógeno ingerido por el pez.

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

La energía metabolizable que no es disipada como calor, es retenida en el cuerpo en forma de nuevos elementos tisulares. En animales en crecimiento, parte de esa energía se retiene en forma de proteína y parte en forma de grasa. En este sentido, proteínas con un alto valor biológico promueven mayor deposición proteica que las de peor calidad.

2.4.4. Retención energética (%).

La retención energética (ER) se define como la relación porcentual entre la ganancia de energía corporal y la energía ingerida por el pez:

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

Para el cálculo del contenido energético corporal se siguió el método indirecto basado en el análisis de los componentes del mismos, seguido de la aplicación de los valores calóricos estándar para cada uno de ellos. Valores medios generalmente aceptados para la completa combustión de carbohidratos, proteínas y lípidos son 17.2, 23.6 y 36.2 Kj/g, respectivamente (BRAFIELD, 1985).

2.4.5. Índice hepatosomático.

El índice hepatosomático (HSI) se define como la relación existente entre el peso del hígado y el peso corporal total y viene definido por la siguiente expresión:

$$\text{HSI} = \frac{\text{Peso hígado (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$

Se ha visto que alteraciones en las dietas pueden provocar acúmulos de glucógeno o grasas en el hígado, haciendo que estos aumenten de tamaño y peso con respecto a lo que

se considera un tamaño normal.

2.4.6. Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente.

Para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) se optó por un método de determinación indirecto, utilizando Cr_2O_3 (0.5%) en las dietas como marcador inerte. Según como se indicó previamente los cambios en las proporciones de nutrientes y marcador en el alimento y las heces, permiten el cálculo indirecto de las digestibilidades aparentes de dichos nutrientes. Para ello se utiliza la siguiente expresión:

$$\text{ADC (\%)} = 100 - (100 \times \frac{\text{Nutriente en heces(\%)} \times \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ (\%)} \text{ en dieta}}{\text{Nutriente en dieta(\%)} \quad \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ (\%)} \text{ en heces}})$$

La digestibilidad total de las dietas vendrá dada por la ecuación:

$$\text{Digestibilidad Total (\%)} = 100 - (100 \times \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ (\%)} \text{ en la dieta}}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ (\%)} \text{ en las heces}})$$

2.5. METODOS ANALITICOS DE COMPOSICION.

En este apartado se describen los métodos de análisis utilizados con las diferentes muestras. Todos los análisis se hicieron por triplicado, salvo en algún caso excepcional en el que el tamaño de muestra sólo permitió hacer duplicados. Todas las muestras excepto los tejidos y órganos de los peces, por su alto contenido en lípidos y/o humedad, fueron homogeneizadas en un Cyclotec de Tecator (Höganäs, Swedden, 1093 Sample Mill), a través de una rejilla de 0.5 mm de luz de malla.

Para el análisis de la composición corporal de los peces, se muestrearon 10 animales al azar al inicio de los ensayos y 3 por cada tanque al final de los mismos. Los peces fueron pesados, secados a 105°C durante 24 h y triturados hasta obtener una harina fina.

2.5.1. Humedad.

La humedad de las muestras se determinó por desecación en estufa a 105°C hasta peso constante según el método de la AOAC (1985).

2.5.2. Ceniza.

El contenido en ceniza fue determinado mediante la incineración de la muestra en horno Mufla a 450°C hasta peso constante según el método de la AOAC (1985).

2.5.3. Proteínas.

El contenido en proteínas (AOAC, 1985) se calculó a partir de la composición en N total de las muestra determinada mediante la técnica **Kjeldhal**. El método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado a 420°C en presencia de un catalizador de mercurio, seguido de una destilación con Na(OH) al 40%, con ácido bórico como sustancia receptora, en una unidad destiladora Tecator (Höganäs, Swedden, Kjeltex System 1003). Por último se realiza una valoración con HCl 0.1N. La conversión a porcentaje de proteína bruta se realizó mediante la siguiente fórmula,

$$\text{Proteínas(\%)} = \frac{(\text{valor ml} - \text{valor media patrón ml}) \times 0.1 \times 14.007 \times 6.25 \times 100}{\text{peso de la muestra (mg)}}$$

2.5.4. Lípidos totales.

El contenido en lípidos totales de las muestras fue determinado mediante el método **Soxhlet** de extracción en caliente de grasas usando eter de petróleo (40-60°). Este sistema se empleó para el análisis de muestras tales como los ingredientes, dietas y carcasas.

En aquellas muestras en las que se necesitó extraer los lípidos en frío para la determinación de su composición en ácidos grasos, o bien en las que se disponía de una pequeña cantidad de muestra como en el caso de las heces y de los hígados de los peces, el método utilizado fue el de extracción con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) (FOLCH et al., 1957).

Para la determinación de **ácidos grasos**, los lípidos obtenidos por el método de **Folch** fueron posteriormente saponificados con etanol y KOH (50%), y metilados con BF_3 . Los ésteres metílicos fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases bajo las siguientes condiciones operativas:

Aparato: Shimadzu (Analytical instrument division, Kyoto, Japan, GC-14-A).

Integrador: Shimadzu C-R5A.

Columna: capilar en sílice fundida con Supelco-10 (30 m x 0.32 mm I.D.).

Gas portador: Helio.

Presión del gas: He_2 1, H_2 0.5, N_2 0.5 y aire 0.5 Kg/cm^2 .

Temperatura: detector 250, inyector 250 y columna 208°C.

2.5.5. Fibra.

El contenido en fibra (AOAC, 1985) fue determinado mediante una digestión ácida de las muestras con H_2SO_4 (0.225 N), seguida de una digestión básica con NaOH (0.313 N) en un sistema de digestión Fibertec System 1020 de la marca Tecator (Höganäs, Swedden). A continuación se seca el residuo obtenido en una estufa a 105°C durante toda la noche, se pesa, se incinera a 600°C durante 2 h y se vuelve a pesar. La proporción de fibra vendrá dada por la expresión:

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{peso (recipiente+residuo)} - \text{peso (recipiente + ceniza)}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

2.5.6. Carbohidratos.

Para la determinación de los carbohidratos se utilizó el método de la **antrona**, consistente en medir a 620 nm la coloración azul-verdosa producida por los compuestos derivados de la reacción entre los productos de la degradación de los carbohidratos y compuestos poliaromáticos tales como la antrona. Para ello se trata a las muestras de la siguiente forma:

- 1- Precipitación de las proteínas contenidas en las muestras con ácido tricloroacético (5% p/v) en un baño a 90°C durante 1 h.

- 2- Centrifugación a 3000 rpm durante 5 min.
- 3- Recuperación del sobrenadante mediante filtración a través de fibra de vidrio.
- 4- Incubación a 100°C durante 7 min de 0.5 ml de sobrenadante, 0.5 ml del estándar de calibración (100 µg de glucosa/ml H₂O) y 5 ml del reactivo de antrona (0.05% en H₂SO₄ con H₂O y alcohol etílico).
- 5- Lectura a 620 nm frente a un blanco.

2.5.7. Determinación de óxido crómico.

El porcentaje de óxido crómico contenido en las muestras fue determinado mediante la digestión de las mismas con ácidos nítrico y preclórico concentrados, evaluando en espectrofotómetro a 350 nm. la coloración amarilla obtenida como consecuencia de la solubilización del Cr (FURUKAWA y TSUKAHARA, 1966).

2.5.8. Energía bruta.

La energía bruta de las muestras fue determinada mediante combustión de las mismas en una bomba calorimétrica incluida en un sistema de calorimetría IKA C-700 (Heitersheim-Germany).

2.5.9. Determinación de la actividad antitripsina.

La determinación de la tripsina inhibida (UTI) sólo se utilizó para el análisis de la harina de soja, basándose en la disminución del grado de hidrólisis de un sustrato natural o sintético causado por la presencia del inhibidor en la muestra. El método envuelve la extracción de los inhibidores de la muestra mediante agitación continua con agua destilada, añadiendo a continuación la solución de la enzima tripsina (bovine trypsin, SIGMA T-0134) dejando durante 7 min. en un baño a 37°C. La actividad de la tripsina remanente es medida entonces por adición del sustrato benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA, SIGMA B-3133) a 37°C durante 10 min; la p-nitroanilida liberada es medida por espectrofotometría a 410 nm (LIU y MARKAKIS, 1989).

Se consideran aceptables para la inclusión en dietas para peces niveles de inhibidor de la tripsina de 1-3 mg por g de harina de soja (AKIYAMA, 1988).

2.5.10. Determinación de la solubilidad de las proteínas en KOH (0.2%).

La determinación de la solubilidad de las proteínas permite conocer si durante el procesamiento de un ingrediente, éste ha sufrido un sobrecalentamiento que pudiera alterar a la disponibilidad de las proteínas, especialmente en aquellos aminoácidos tales como la lisina o la arginina que son muy susceptibles al calor. El método sólo se utilizó para análisis de la harina de soja y está basado en la relación inversa encontrada entre la solubilidad de las proteínas en KOH (0.2%) y el calor a que es sometida la muestra. La determinación de la proteína soluble final se hace mediante el análisis del contenido en nitrógeno por el método Kjeldhal.

Un valor de índice de solubilidad de la proteína entre 60-80 se puede considerar óptimo en los alimentos para peces (AKIYAMA, 1988).

2.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS.

2.6.1. Preparación de extractos.

El estudio de la actividad de los enzimas digestivos fue realizado en 9 peces de cada tratamiento. Para ello se extrajo de cada uno una porción de aproximadamente 1 cm del digestivo medio, conteniendo los ciegos pilóricos y parte del intestino proximal. Se pesó y homogeneizó (1:10 p/v) en buffer Tris-HCl (300 mM, pH 8.1) enfriado previamente, centrifugando a continuación a 14.000 rpm (4°C, 15 min). Los sobrenadantes así obtenidos fueron utilizados para medir las actividades.

2.6.2. Actividad trípica.

La actividad trípica fue medida a 25°C con BAPNA (N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide) como sustrato específico. La mezcla de reacción consistió en 50 µl de BAPNA (0.25 mM en buffer Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.1, conteniendo 20 mM de CaCl₂), 430 µl de buffer Tris-HCl y 20 µl de extracto enzimático. El tiempo de reacción fue de 10 min, calculándose la actividad por el incremento de absorción a 25°C y 405 nm (HOFER y UDDIN, 1985). La actividad se expresó como mUnidades/mg de proteína soluble. La proteína soluble de los

extractos fue determinada de acuerdo con BRADFORD (1976).

2.6.3. Actividad amilásica.

La actividad amilásica se realizó mediante la agregación de 0.1 ml de cada uno de los sobrenadantes a 1 ml de almidón soluble (1% p/v en agua destilada). La mezcla de reacción fue incubada a 25°C durante 10 min. Una vez pasado este tiempo se añadieron 5 ml de reactivo de maltosa (ADNS), volviendo a incubar durante 5 min en agua hirviendo. Las lecturas se hicieron a 540 nm, expresando los resultados como unidades/mg de proteína soluble. La proteína soluble fue determinada según BRADFORD (1976).

2.7. DETERMINACION DE NIVELES DE EXCRECION DE AMONIO.

Las muestras de agua de los tanques recogidas durante los ensayos de excreción de amonio fueron procesadas usando un analizador por inyección de flujo de la marca Tecator, Höganäs, Swedden, modelo FIA star 5010. El método (Tecator appl. ASN 50-01/84), con algunas modificaciones para adaptarlo a agua salada, consiste en someter a la muestra a un pH básico (NaOH 1.5M), con lo que se convertirá el NH_4^+ en NH_3 gas, que pasará por difusión a través de una membrana de intercambio iónico. A continuación se le hace reaccionar con un colorante (indofenol), determinándose su concentración por espectrofotometría a 590 nm.

2.8. METODOS HISTOLOGICOS.

Las muestras utilizadas para estudios histológicos fueron fijadas con buffer de formalina neutra al 10%. Posteriormente los bloques fueron incluidos en parafina y los cortes de cada uno teñidos con hematoxilina y eosina o con ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS), para posteriores observaciones al microscopio (MARTOJA y MARTOJA-PIERSON, 1970). Las tinciones o reacciones PAS positivas aportan información principalmente sobre las deposiciones de glucógeno y mucopolisacáridos en el tejido estudiado.

Los estudios fueron realizados principalmente en el tejido hepático, ya que son muchos los autores que afirman que los cambios hepáticos pueden ser usados como un indicador de las condiciones nutricionales y fisiológicas en los peces (HIBIYA, 1982; STORCH y JUARIO, 1983; SEGNER y JUARIO, 1986). Según ORACHUNWONG et al. (1988), la comparación de observaciones entre la histología del hígado y el crecimiento de los peces ayudan a un mejor entendimiento sobre la utilización de las dietas por los peces.

2.9. TRATAMIENTOS ESTADISTICOS.

Los datos en todos los experimentos fueron sometidos a análisis de varianza de una entrada (ANOVA), siendo las diferencias entre medias comparadas por el test de Tukey con un intervalo de confianza del 95% ($P \leq 0.05$) (ZAR, 1984).

En los casos en que se obtuvo un valor para $P \leq 0.05$ en el test de Bartlett de homogeneidad de las varianzas, los datos fueron transformados previamente y luego analizados según el test de Tukey. Por último, aquellos datos cuyas transformadas no mejoraban el valor de la P de Bartlett fueron sometidos al test no paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1984).

3. EFECTO DE LA INCLUSION DIETETICA DE HARINAS DE SOJA, ALTRAMUZ, GLUTEN DE MAIZ, Y CARNE Y HUESOS EN EL CRECIMIENTO Y UTILIZACION DEL ALIMENTO DE LOS JUVENILES DE DORADA.

3.1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

A nivel comercial, el principal objetivo de la producción acuícola es el de maximizar el crecimiento y la supervivencia al mínimo costo (KNIGHTS, 1985).

La importancia, tanto cualitativa como cuantitativa, de la proteína como ingrediente en dietas para peces ha sido enfatizada por los nutricionistas en multitud de trabajos (NRC, 1977, 1983; COWEY, 1979; HALVER y TIEWS, 1979; PANDIAN y VIVEKANANDAN, 1985; TACON y COWEY, 1985; WILSON y HALVER, 1986; STEFFENS, 1987; DE LA HIGUERA, 1989; KAUSHIK, 1990).

En régimen de producción animal la proteína de cualquier dieta se utiliza fundamentalmente con fines de mantenimiento y crecimiento. Desde un punto de vista práctico, lo que interesa evidentemente, es destinar la mayor parte de la proteína dietaria hacia el crecimiento, minimizando el costo proteico de mantenimiento, que incluye síntesis de proteínas funcionales, gluconeogénesis y energía. Como se ha mencionado en apartados anteriores, el aprovechamiento de la proteína dietaria por el pez, es decir, la relación existente entre la proteína acumulada y la proteína consumida, se ve influida por multitud de factores (COWEY, 1975, 1980; STEFFENS, 1981).

Aunque, como se ha expuesto anteriormente, está ampliamente demostrada la utilidad de la harina de pescado como fuente de proteína en los piensos para acuicultura debido a los excelentes resultados de crecimiento y utilización nutritiva a que da lugar, los problemas que últimamente conlleva su empleo han determinado que multitud de investigadores orienten sus esfuerzos hacia la búsqueda de otras fuentes de proteína capaces de reemplazar total o parcialmente a esta materia prima en la formulación de las dietas.

En este sentido, es posible encontrar una amplia variedad de trabajos en los que se estudia de manera comparada el valor nutritivo de diferentes tipos de ingredientes proteicos,

tanto de origen vegetal como animal en relación a la harina de pescado, valorando los resultados de su utilización en el crecimiento y aprovechamiento del alimento por distintas especies de peces.

En el presente capítulo se estudia el efecto de incluir las cuatro materias primas cuya selección se justifica en el capítulo anterior en piensos para dorada, y se presentan resultados relativos al crecimiento y utilización nutritiva de las distintas fórmulas. Se aportan evidencias además de posibles alteraciones histológicas relacionadas con el uso nutritivo de determinados ingredientes. Con este objeto se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que dichas materias primas fueron incluidas a distintos niveles en dietas experimentales para juveniles de esta especie.

3.2. EXPERIMENTO 1. SOJA Y ALTRAMUZ.¹

3.2.1. INTRODUCCION.

Los ensayos realizados con **harina de soja** como único o principal componente proteico de las dietas para trucha han dado como resultado pobres índices de crecimiento y conversión del alimento, así como elevadas tasas de mortalidad (RUMSEY y KETOLA, 1975; SPINELLI et al., 1979). Sin embargo, otros autores (LIEBOWITZ, 1981) muestran que en piensos para pez gato la soja puede llegar a sustituir totalmente a la harina de pescado mientras se cubran las necesidades de P y energía.

Por otro lado, la sustitución parcial de la harina de soja en dietas para peces aparece ampliamente documentada en la bibliografía, observándose resultados contradictorios en diferentes trabajos. Así tenemos que SPINELLI et al., (1979) encontraron que niveles de sustitución del 50% de la harina de pescado por harina de soja en una dieta OMP (Oregon Moist Pellet) para **salmón coho** de 30 g de peso medio inicial resultaron en una reducción del crecimiento y la conversión de alimento de un 20% y un 23% respectivamente. Niveles de sustitución mayores al 50% resultaron completamente inadecuados. En el caso de la **trucha arco iris**, ALEXIS et al. (1985), comprobaron que las sustituciones de hasta un 30% de la proteína dietaria (45%) resultaron en tasas de crecimiento y conversión del alimento semejantes a las obtenidas para la proteína de pescado. Estos resultados fueron corroborados por BUDDINGTON y HILTON (1987), quienes obtuvieron buenos índices de crecimiento en truchas arco iris de 25 g alimentadas con 26,7% de harina de soja en una dieta conteniendo un 49% de proteína durante 20 semanas. Posteriormente, MOYANO et al., 1992, comprobaron que niveles de sustitución de hasta un 45% de la proteína de harina de pescado por harina de soja no afectaron al crecimiento, aceptación y conversión del alimento, así como a las propiedades organolépticas de los peces, con respecto a aquellos alimentados con un pienso comercial o con una dieta control a base de harina de pescado como única fuente proteica.

(1) Parte de los resultados del presente experimento han sido publicados en la revista *Aquaculture*, 1995, vol. 130: 219-233.

Para **tilapias** sometidas a condiciones prácticas de cultivo en Israel, sustituciones de la mitad de la harina de pescado por harina de soja, sin ningún tipo de suplementación, resultaron en dietas nutricionalmente equivalentes (VIOLA y ARIELY, 1983). Por otra parte, sustituciones completas de la harina de pescado por harina de soja, si se suplementa la soja con 3% de fosfato di-cálcico y 2% de aceite de aves, dieron resultados de crecimiento iguales a aquellos que se obtuvieron para el harina de pescado (VIOLA et al., 1988).

En contraposición en **pez gato** ANDREWS y PAGE (1974), encontraron que la inclusión de harina de soja en las dietas producía un crecimiento y eficacia alimenticia significativamente reducidos, resultados que no se vieron mejorados por la suplementación de la harina de soja con extractos lipídicos, o adición de aminoácidos puros (metionina, cistina o lisina). MOHSEN y LOVELL (1990), trabajando también con esta misma especie mostraron que en individuos de 18 g de peso inicial, a medida que se aumentaba la proporción de proteína de origen animal (harina de pescado y/o harina de carne y huesos y harina de sangre) frente a la harina de soja en un pienso control con harina de soja como única fuente de proteína, se incrementaban el peso y la ganancia proteica y lipídica por los peces.

Experimentos con **platija**, *Pleuronectes platessa*, muestran unos resultados de crecimiento similares a los obtenidos con harina de pescado como única fuente proteica cuando un 40% de la proteína dietaria de pescado fue sustituida por proteína de soja, sin embargo, reemplazando un 45% de la proteína de pescado por harina de soja libre de inhibidores trísicos, se obtuvieron un crecimiento y utilización nutritiva significativamente menores después de 12 semanas de alimentación (COWEY et al., 1971).

En dietas húmedas para **seriola**, sustituciones de la harina de pescado por harina de soja por encima del 30% resultaron en un mal aprovechamiento del alimento, incluso suplementando las dietas con aminoácidos, fósforo y atractantes (LEE et al., 1991). Trabajos posteriores corroboran que hasta un 30% de sustitución de la harina de pescado por harina de soja en piensos para esta especie dan resultados semejantes al control de harina de pescado (VIYEKARN et al., 1992; SHIMENO et al., 1992). TAKII et al. (1989), también encontraron buenos resultados de crecimiento y utilización del alimento cuando se usó un concentrado de proteína de soja, suplementado con aminoácidos, para reemplazar un 20% del harina de pescado en dietas para juveniles de esta especie.

En el caso de juveniles de **lubina**, se observaron buenos resultados de crecimiento y factor de conversión, en la utilización en las dietas de hasta un 20% de harinas de soja y gluten de maíz como sustitutos del harina de pescado (ALLIOT et al., 1979). Por último, para la **dorada japonesa** se obtuvieron buenos resultados de crecimiento con un 53% de la proteína dietaria constituida por una mezcla de harinas de soja y de gluten de maíz (INA, 1981).

En adición a estos variables resultados, hay que tener en cuenta el hecho de que la soja no es un ingrediente disponible en todo el mundo, por lo que se ha visto una creciente necesidad de investigar la posibilidad de usar otras fuentes vegetales de proteínas con un valor nutritivo comparable al de la soja. La **harina de semillas de altramuz**, por los motivos que se especificaron en el Apdo. 1.5., ha sido considerada como una de las materias primas de elevado potencial en este sentido.

Así GROOP et al. (1979), obtuvieron resultados satisfactorios con niveles de inclusión de hasta un 20% de harina de altramuz (9% de proteína en la dieta) en piensos para **trucha arco iris**. Estudios posteriores con esta misma especie muestran que la harina de semilla de altramúz crudo (*Lupinus albinus*) puede ser incorporado hasta niveles de un 30-40% en las dietas (HUGHES, 1988; GOMES y KAUSHIK, 1989b). HUGHES (1988), señaló la ventaja económica del uso de la harina de altramuz como fuente proteica alternativa en dietas para trucha, puesto que incluso a un nivel de incorporación del 40% en la dieta, los resultados obtenidos eran comparables a los que se obtendrían con harina de soja sin desengrasar, teniendo en cuenta el precio más elevado de esta última. En el caso de la harina de semilla de la variedad, *Lupinus albus*, tratada o no con calor/expansión, niveles de sustitución del 20% de la harina de pescado en dietas para trucha arco iris, dieron mejores resultados de crecimiento y utilización del alimento que sustituciones similares por harina de semilla de guisante, *Pisum sativum*, y harina de habas, *Vicia faba*, (DE LA HIGUERA et al., 1988). MOYANO et al. (1992), encontraron que el nivel óptimo de sustitución de la proteína de pescado por harina de altramuces en piensos para trucha arco iris era del 30%, no afectando la inclusión al crecimiento, aceptación y conversión del alimento respecto a aquellos alimentados con un pienso comercial o con una dieta control compuesta por harina de pescado como única fuente proteica. Los resultados obtenidos con otra variedad de altramuz, *Lupinus angustifolius*, confirman los beneficios del uso de esta proteína vegetal como fuente

sustitutoria de la harina de pescado en dietas para trucha (KAUSHIK, 1989 en Progress in Fish Nutr.).

3.2.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

De los ingredientes proteicos a utilizar en este experimento, la harina de pescado fue suministrada por la empresa AGRAMAR S.A., y la harina de soja y las semillas de altramu z (*Lupinus angustifolius*), fueron obtenidas a través de importadores locales. En el harina de soja se determinaron la actividad de los inhibidores de tripsina y la solubilidad de las proteínas en KOH 0,2%, según la metodología expuesta en los Apdos. 2.5.9. y 2.5.10., respectivamente. Los resultados de estos análisis indicaron que la harina había recibido un tratamiento con calor apropiado. La composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos para el presente experimento se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos experimentales con harinas de soja y altramu z (g/100 g peso seco).

INGREDIENTES	HARINA DE PESCADO	HARINA DE SOJA	HARINA DE ALTRAMUZ
Proteínas	62.40	49.88	42.89
Lípidos	8.34	2.59	15.30
Ceniza	17.37	6.37	3.52
Fibra	9.94	13.92	20.24
Carbohidratos*	1.95	27.24	18.05
Humedad	5.87	10.49	9.09

* Calculados por diferencia (100- resto ingredientes).

Una vez preparados y analizados los ingredientes, se formularon dos grupos de dietas experimentales en las que se reemplazó en cada una el 10, 20   30% de la proteína de la harina de pescado por proteínas de harina de soja o de altramu z (Tabla 9), asignándosele a

cada una de ellas una clave con la inicial de la fuente proteica alternativa seguida por el nivel de sustitución de la misma:

S10, S20 y S30 para la harina de soja.

A10, A20 y A30 para la harina de altramuz.

La composición de los piensos resultantes aparece en la Tabla 9, los aminogramas calculados de los mismos en la Tabla 10 y el cómputo químico y porcentaje de deficiencia para el primer aminoácido limitante frente a las necesidades de aminoácidos esenciales para dorada en la Tabla 11.

En el caso de las dietas que contenían altramuz, debido al elevado contenido en grasas encontrado en esta materia prima, se consideró necesario añadir una mezcla de triacilglicéridos conteniendo un 42% de n-3 HUFA con los que alcanzar el nivel de ácidos grasos esenciales adecuado para esta especie (IBEAS et al., 1994). La composición en ácidos grasos de los diferentes ingredientes incluidos en las fórmulas dietarias del presente ensayo se muestran en los anexos I y II.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron doradas de 40 g de peso medio inicial que fueron aclimatadas durante 3 semanas al tratamiento control en un tanque de 1000 l, antes de ser anestesiadas, pesadas y repartidas al azar en los tanques experimentales en grupos de 12 peces por tanque.

Los tanques fueron provistos de flujo continuo (1 l/min) de agua de mar ($19 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$), siendo el valor medio de pH medido a lo largo del experimento de 8.23 ± 0.14 ; y los peces fueron alimentados "ad libitum" cuatro veces al día, (09:00, 12:00, 15:00 y 18:00), manteniendo un fotoperíodo constante de 12 h luz/12 h oscuridad durante 60 días de experimentación.

Tabla 9. Formulación y composición de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de soja y altramuiz.

INGREDIENTES (% peso húmedo)	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
Harina de pescado	76.61	68.95	61.29	53.63	68.95	61.29	53.63
Harina de soja	-	10.08	20.16	30.24	-	-	-
Harina de altramuiz	-	-	-	-	11.54	23.08	34.62
Aceite de pescado	5.99	6.59	7.19	7.79	4.13	2.30	0.43
EPA 42 ³	-	-	-	-	0.85	1.68	2.54
Almidón de maíz	4.08	4.08	4.08	4.08	4.08	4.08	4.08
Dextrina	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36
Vitaminas ¹	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Minerales ²	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
CMC ⁴	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α -Celulosa	9.06	6.04	3.02	-	6.19	3.31	0.44
COMPOSICION (% peso seco)							
Humedad	6.06	5.95	8.67	9.36	6.34	7.83	10.20
Proteínas	55.78	57.13	55.35	55.45	56.32	55.88	52.92
Lípidos	13.23	12.71	13.25	13.80	12.58	11.83	11.43
Ceniza	14.90	13.76	11.96	12.16	11.98	11.99	11.37
Fibra	7.16	5.68	4.01	2.45	6.98	5.61	4.86
Carbohidratos ⁵	8.93	10.72	15.43	16.14	12.14	14.69	19.42
Energía bruta (Kj/g)	18.12	18.93	18.47	16.95	16.83	16.77	18.07

(1) y (2) Composición de las mezclas en la Tabla 6. En la mezcla de vitaminas se añadió un 0.5% de Cr₂O₃ a expensas de la α -celulosa contenida en la misma.

(3) Mezcla de triacilglicéridos (42% n-3 HUFA).

(4) Carboximetil celulosa.

(5) Calculados por diferencia (100-resto ingredientes).

Tabla 10. Composición en aminoácidos esenciales calculados para las dietas experimentales con harinas de soja y altramuza (expresados en % de la proteína).

	AA*	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
Arg	4.33	6.78	6.73	6.67	6.62	7.38	7.98	8.59
His	1.82	3.21	3.09	2.97	2.85	3.12	3.03	2.94
Ile	3.76	3.21	3.51	3.81	4.10	3.36	3.51	3.66
Leu	5.24	8.03	8.04	8.05	8.06	7.92	7.81	7.70
Lys	5.49	8.03	7.83	7.63	7.43	7.68	7.33	6.99
Met	2.00	3.21	2.99	2.78	2.56	2.88	2.55	2.22
Phe	2.53	3.21	3.32	3.43	3.54	3.12	3.03	2.94
Thr	3.69	4.82	4.68	4.53	4.39	4.56	4.30	4.05
Trp	0.50	1.61	1.55	1.49	1.44	1.68	1.75	1.83
Val	3.27	3.21	3.51	3.81	4.10	3.12	3.03	2.94

* Necesidades en aminoácidos para dorada calculados en base a la composición corporal de la misma (VERGARA, 1992).

Tabla 11. C  puto químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de cada una de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de soja y altramuç, frente a las necesidades en AAE para dorada.

	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
C��puto químico	85.37	93.09	-	-	89.36	92.66	89.91
% deficiencia	14.63	6.91	-	-	10.64	7.34	10.09
Primer AAE limitante	Ile	Ile	-	-	Ile	Val	Val

3.2.3. RESULTADOS.

CRECIMIENTO Y UTILIZACION DEL ALIMENTO.

La aceptación de todas las dietas fue buena, no observándose mortalidad durante el período experimental. La media de ingest  n diaria del alimento osciló entre 1.19 y 1.34 g/100g de pez, no viéndose ésta influenciada por el tipo o nivel de ingrediente vegetal empleado en la dieta. De esta manera, como se observa en la Tabla 12, tanto las ingestas totales, como las ingestas proteicas obtenidas para los distintos tratamientos fueron significativamente semejantes. De igual forma, el crecimiento de los peces expresado en términos de incremento de peso (Fig. 6), no se vió afectado estadísticamente por el tipo o nivel de sustitución de la proteína vegetal en las dietas (Tabla 12). A nivel general se observó que comparando entre los dos grupos de dietas (soja y altramuç), el crecimiento resultó ligeramente superior en los peces alimentados con los piensos que incluyeron soja respecto a los de altramuç, a igual nivel de sustitución. Los mayores incrementos de peso fueron observados en los peces alimentados con la dieta S10, siendo éstos significativamente mayores que los de los peces alimentados con la dieta A30.

Los índices hepatosomáticos (HSI) no difirieron entre los peces alimentados con los distintos tratamientos (Tabla 12).

Los valores de FE (Tabla 12) resultaron semejantes en todos los casos, no observándose

tampoco efectos del tipo de ingrediente vegetal. La FE para los peces alimentados con las dietas S10 y A10 fue significativamente mayor que aquellos alimentados con la dieta A20. En el caso del PER los resultados tampoco se vieron negativamente afectados por el tipo de proteína vegetal, mostrando resultados bastante similares para los diferentes grupos. El PER fue significativamente mayor en los peces alimentados con la dieta S20 que en aquellos alimentados con la dieta A20.

El estudio de la retención proteica, medida por el PPV, reveló que ésta no se vió significativamente influenciada por el tipo de ingrediente vegetal, siendo los valores obtenidos para los peces alimentados con las dietas A10 y S20 menores que aquéllos obtenidos para el grupo control (Tabla 12). Los peces alimentados con los tratamientos que incluían altramuiz mostraron una cierta tendencia a aumentar la retención proteica con el incremento de esta materia prima en el pienso.

Tabla 12. Crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y de la proteína e índice hepatosomático para los piensos experimentales con harinas de soja y altramuz.

	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
Peso medio inicial (g)	38.37 ^a ±1.99	40.29 ^a ±0.82	39.38 ^a ±0.75	37.00 ^a ±0.98	38.55 ^a ±1.94	38.68 ^a ±0.76	39.63 ^a ±0.79
Peso medio final (g)	60.09 ^{ab} ±2.92	64.46 ^c ±2.33	62.02 ^{bc} ±1.31	56.49 ^a ±1.36	60.28 ^{ab} ±2.39	59.06 ^{ab} ±0.56	61.46 ^{bc} ±3.21
Incremento peso (% peso inicial)	56.70 ^{ab} ±6.19	59.97 ^b ±5.68	57.50 ^{ab} ±3.20	52.67 ^{ab} ±2.18	56.42 ^{ab} ±3.23	52.77 ^{ab} ±4.20	51.76 ^a ±5.26
Ingesta total (g)	428.66 ^a ±14.36	462.97 ^a ±21.90	446.09 ^a ±21.70	427.32 ^a ±51.77	416.39 ^a ±15.24	462.32 ^a ±25.92	441.46 ^a ±35.12
Ingesta proteica (g)	227.20 ^a ±3.73	248.76 ^a ±11.77	225.51 ^a ±10.97	210.90 ^a ±25.55	219.64 ^a ±8.04	238.11 ^a ±13.35	208.77 ^a ±17.56
FE	0.61 ^{ab} ±0.07	0.63 ^b ±0.04	0.61 ^{ab} ±0.05	0.55 ^{ab} ±0.06	0.63 ^b ±0.04	0.53 ^a ±0.03	0.56 ^{ab} ±0.06
PER	1.15 ^{ab} ±0.12	1.16 ^{ab} ±0.08	1.21 ^b ±0.09	1.12 ^{ab} ±0.12	1.18 ^{ab} ±0.07	1.03 ^a ±0.05	1.19 ^{ab} ±0.12
PPV	24.91 ^{cd} ±2.38	22.39 ^{bc} ±1.04	19.70 ^{ab} ±1.10	21.95 ^{abc} ±2.98	19.01 ^a ±0.51	24.87 ^{cd} ±1.40	27.66 ^d ±2.22
HSI	1.31 ^a ±0.31	1.29 ^a ±0.26	1.28 ^a ±0.13	1.38 ^a ±0.18	1.45 ^a ±0.23	1.60 ^a ±0.23	1.38 ^a ±0.16

*Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

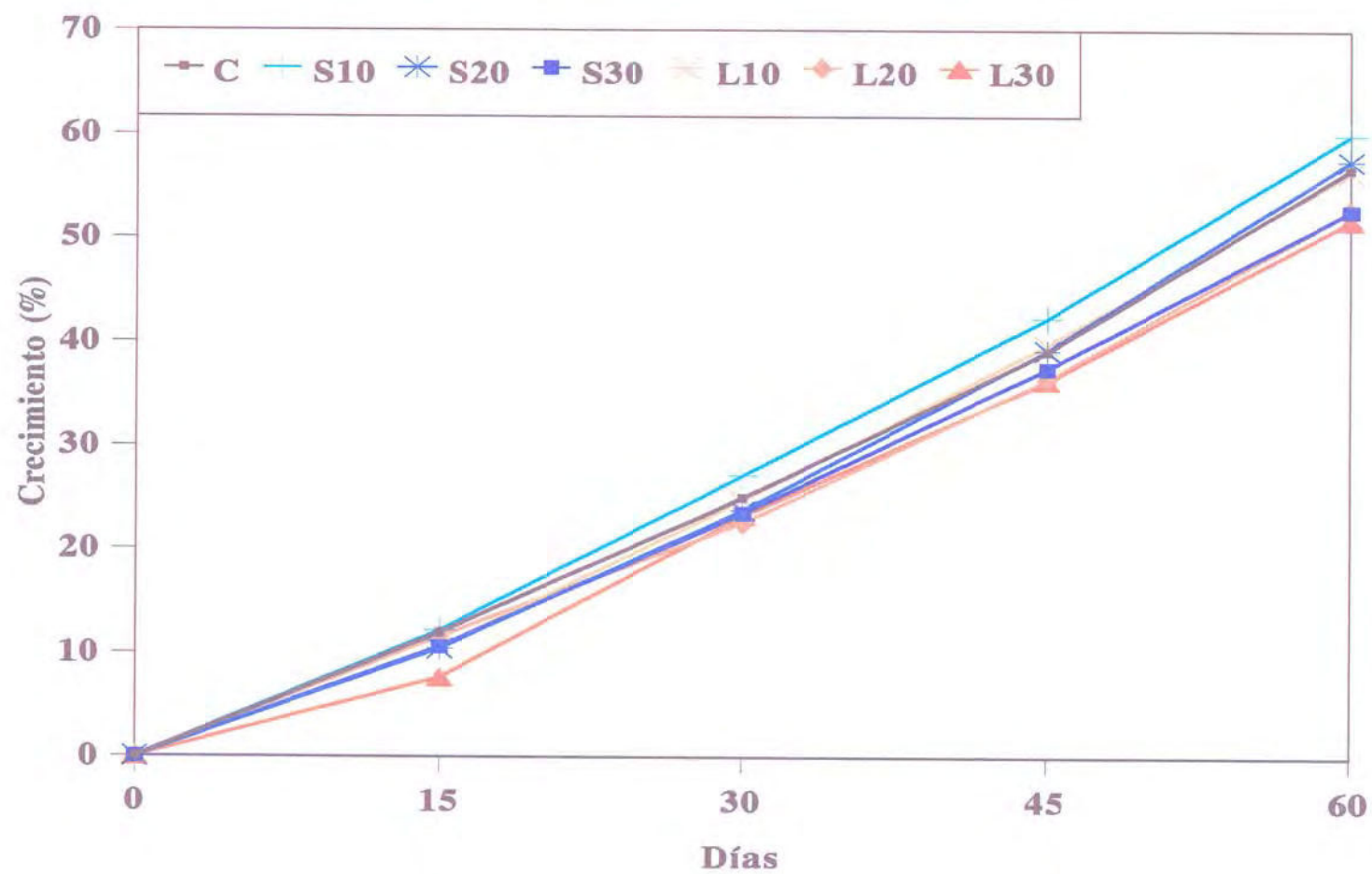


Fig. 6. Incremento de peso (% sobre el peso inicial).

COMPOSICION CORPORAL DE LOS PECES.

Los resultados obtenidos para la composición corporal final de los peces utilizados en el presente experimento aparecen en la Tabla 13. En la misma se observa que la inclusión de materias primas vegetales en la ración no afectó de forma significativa a la composición corporal de los peces, excepto en el caso de los peces alimentados con la dieta A10 que presentaron un contenido en proteínas significativamente menor que los peces control; y en el caso de aquellos alimentados con las dietas A20 y A30, cuya composición en lípidos también resultó ser significativamente menor que la de los peces control. Por otro lado, se apreció un significativo aumento del nivel de proteína en los peces alimentados con piensos de alto contenido en harina de altramuz (dietas A20 y A30), siendo éstos superiores a los de los peces alimentados con harina de soja a los mismos niveles de sustitución. En relación a la humedad los valores obtenidos fueron muy homogéneos para los diferentes tratamientos. Los valores calculados de retención energética (Tabla 13) oscilaron entre un 25% y un 34% para todos los grupos experimentales, existiendo diferencias significativas sólo entre los peces alimentados con la dieta S20, que resultó mayor que en los peces alimentados con la dieta A20.

ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Los valores obtenidos para la actividad de la tripsina muestran grandes variaciones entre los diferentes grupos experimentales, variando entre 8 y 180 mUnidades/mg de proteína soluble (Tabla 14). Los valores de la actividad proteásica en los peces alimentados con las dietas en las que se incluyó harina de altramuz, decrecieron al incrementar el nivel de sustitución. También se observó una reducción significativa en la actividad de la tripsina en los peces alimentados con dietas que incluían un 30% de harina de soja.

La actividad amilásica (Tabla 14) medida en peces alimentados con dietas que incluían soja fue claramente mayor que la obtenida en peces que consumieron piensos con altramuz. Por otra parte, se apreció como dicha actividad era más reducida en aquellos peces alimentados con raciones que incluían una mayor cantidad de de harina vegetal en la dieta y por consiguiente, consumían una mayor proporción de carbohidratos. Este efecto se hizo especialmente patente cuando el pienso incluía altramuz.

Tabla 13. Composición corporal y tasa de retención energética de los peces utilizados en el experimento con harinas de soja y altramuz.

COMPOSICION (% peso seco)	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
Proteínas	56.08 ^{bcd} ±1.28	56.96 ^{cd} ±2.42	52.87 ^{ab} ±3.19	53.64 ^{abc} ±0.92	51.98 ^a ±3.03	58.22 ^d ±3.02	57.67 ^d ±0.73
Lípidos	31.88 ^b ±1.64	29.39 ^{ab} ±2.71	32.55 ^b ±1.02	30.16 ^{ab} ±1.61	30.46 ^{ab} ±1.85	27.60 ^a ±2.56	28.56 ^a ±1.54
Humedad	67.06 ^a ±0.85	67.65 ^a ±1.00	66.88 ^a ±0.95	68.25 ^a ±0.92	66.98 ^a ±1.80	68.57 ^a ±1.43	68.43 ^a ±0.20
RETENCION ENERGETICA (%)	33.85 ^{bc} ±3.95	30.29 ^{abc} ±1.83	34.08 ^c ±1.32	27.05 ^{ab} ±2.89	32.35 ^{abc} ±1.91	25.63 ^a ±1.36	28.24 ^{abc} ±3.14

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Tabla 14. Actividades enzimáticas digestivas determinadas en peces alimentados con las dietas experimentales (mU/mg prot. sol.).

	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
Actividad trípica	0.12 ^d ±0.06	0.09 ^{cd} ±0.04	0.15 ^d ±0.07	0.02 ^{ab} ±0.01	0.04 ^{bc} ±0.02	0.01 ^a ±0.0004	0.01 ^a ±0.0003
Actividad amilásica	13.22 ^c ±2.77	11.28 ^c ±2.60	18.80 ^d ±4.25	4.40 ^{ab} ±0.89	6.36 ^b ±2.38	4.13 ^{ab} ±1.62	2.16 ^a ±0.67

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

Las muestras de los hígados de los peces alimentados con las harinas vegetales fueron comparadas con aquellas de los peces alimentados con la dieta control, que no mostraron ninguna alteración con respecto a una histología normal (Fig. 7). Alrededor del tejido pancreático, se observó un mayor número de depósitos lipídicos en los hígados de los peces alimentados con las dietas que contenían harina de soja (Figs. 8 y 9), encontrándose además núcleos desplazados hacia la periferia en los hepatocitos cuando el nivel de sustitución de la harina de soja en la dieta fue igual o mayor al 20%. También se constató una reducción en las deposiciones de sustancias PAS positivas (presumiblemente glucógeno) en el tejido hepático, que se difuminaban a medida que la proporción de harina de soja se incrementaba en la dieta. Por otra parte, en algunas muestras de peces alimentados con la dieta S30 se presentaron áreas con elevados niveles de vacuolización, desorganización de los hepatocitos y focos necróticos puntuales. Sin embargo, la histología del hígado de los peces que habían sido alimentados con dietas en las que se incluyó harina de altramuz fue muy similar a los de los peces alimentados con la dieta control. Se observó un pequeño número de gotas lipídicas, junto con alguna reducción en los depósitos de glucógeno en el citoplasma de los hígados de los peces alimentados con las dietas A20 y A30 (Figs. 10 y 11).

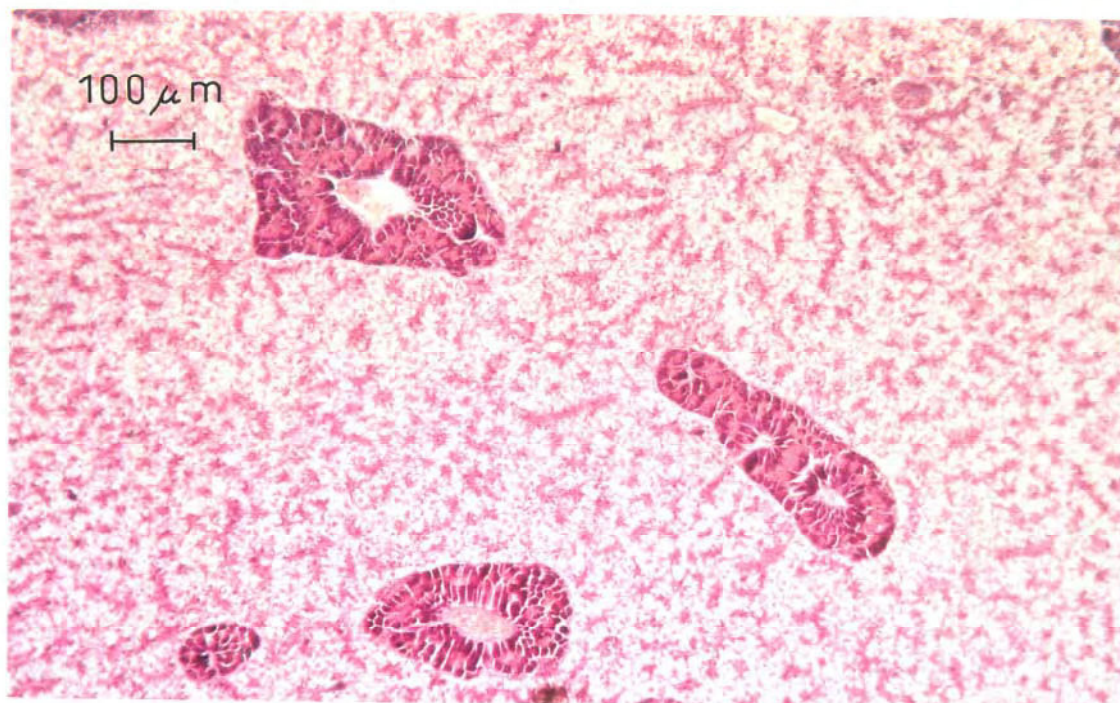


Fig. 7. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta control.

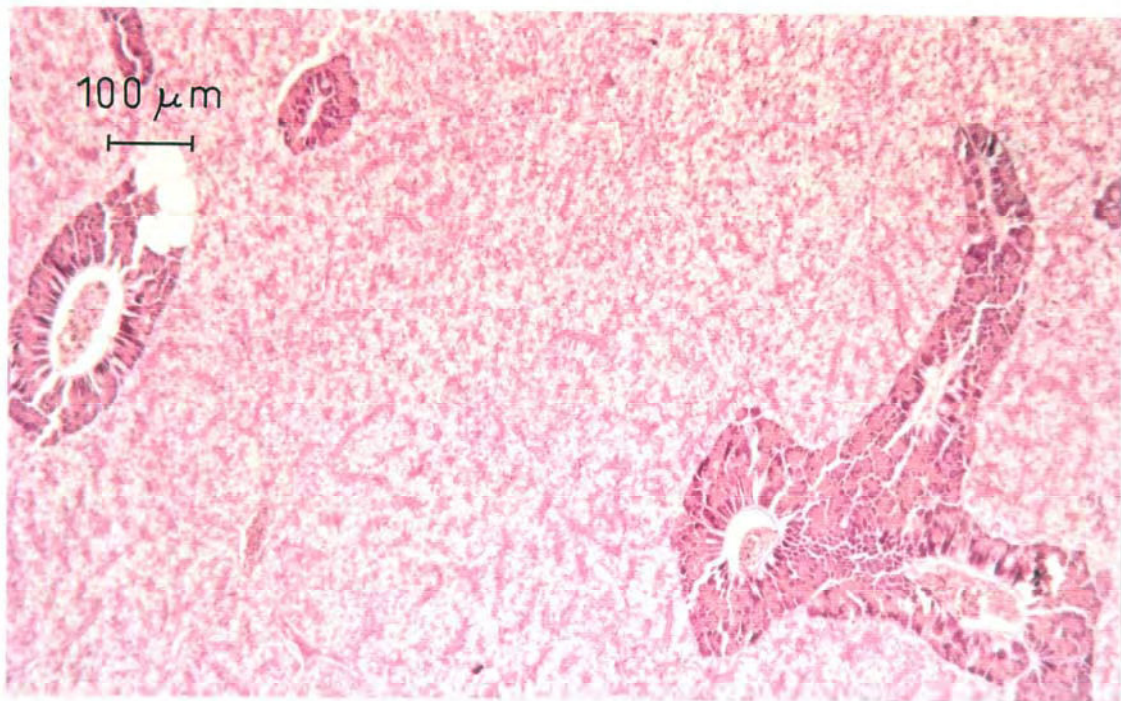


Fig. 8. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S20.

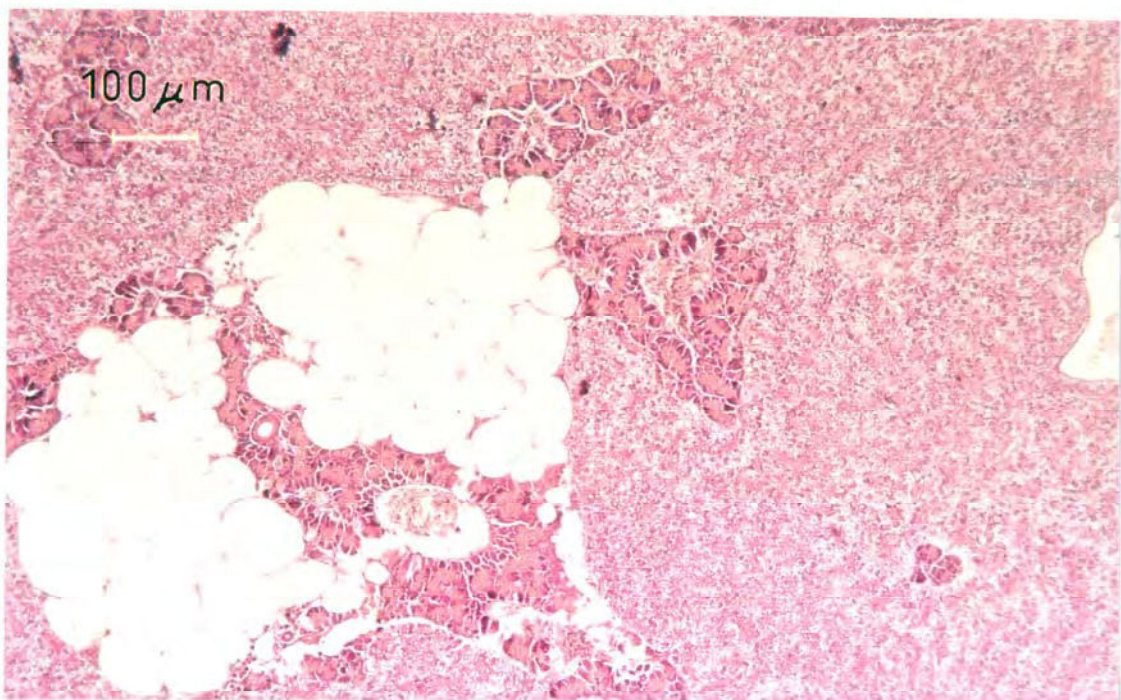


Fig. 9. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30.

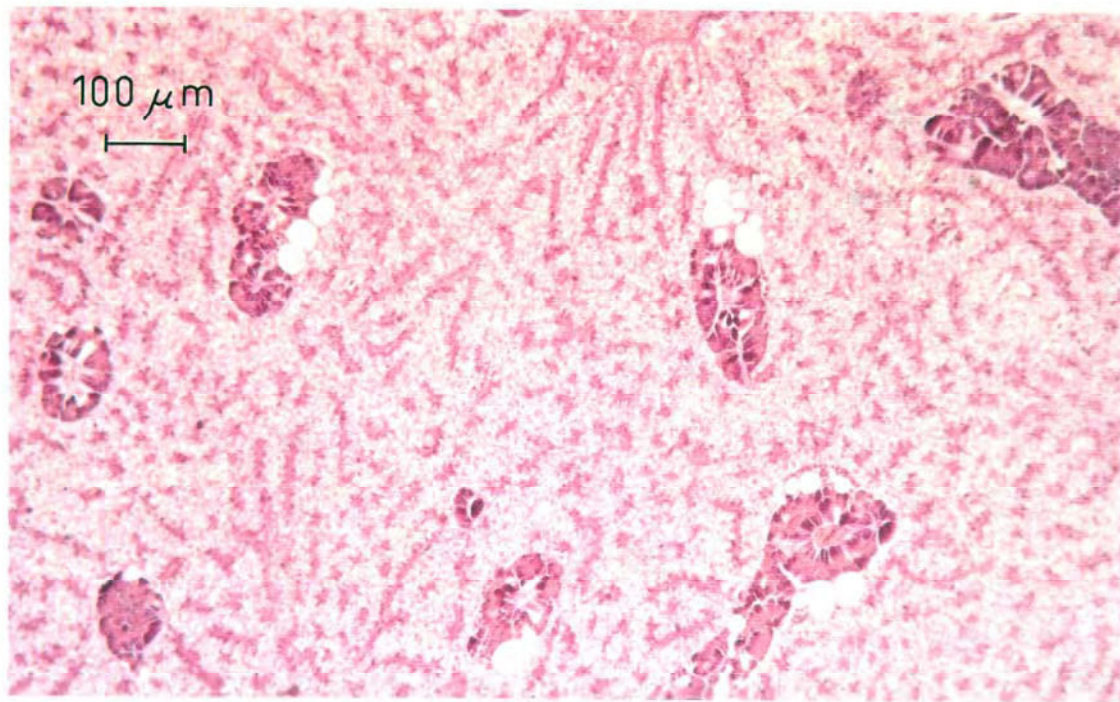


Fig. 10. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta L20.

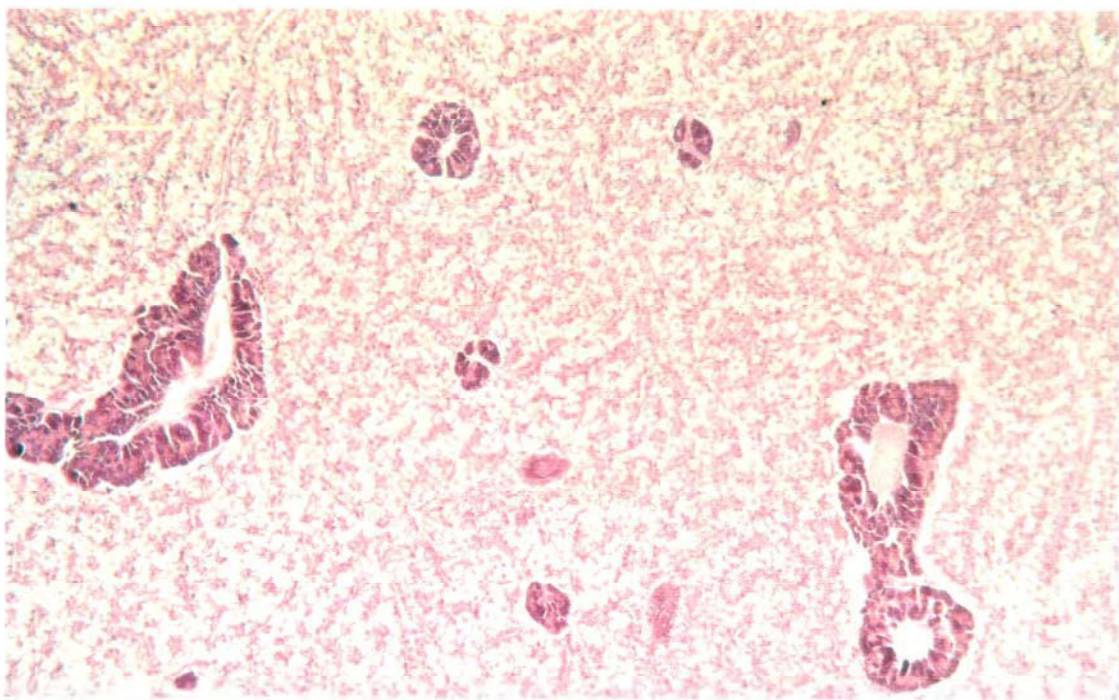


Fig. 11. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta L30.

3.2.4. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En primer lugar se debe resaltar la buena aceptación de todos los tratamientos experimentales, teniendo en cuenta que las dietas con mayor nivel de sustitución contuvieron del total de las fórmulas un 30 y un 35% de harina de soja y de altramuz respectivamente. En contraposición, diferentes autores (REINITZ, 1980; JACKSON et al., 1982; ROSELUND, 1986; VIYAKARN et al., 1992; HAJEN et al., 1993) han observado en distintas especies una reducción importante en la ingesta de las dietas que contienen niveles crecientes de ingredientes proteicos vegetales.

Estas observaciones parecen estar asociadas principalmente con la gran sensibilidad del pez a las propiedades organolépticas de sus dietas (BONE y MARSHALL, 1982). En juveniles de salmon chinook, por ejemplo, se tuvieron ingestas extremadamente bajas para dietas conteniendo niveles de un 15% y 30% de harina de soja y concentrados proteicos de soja, los cuales fueron relacionados con una mala palatabilidad de esos productos (HAJEN et al., 1993). Esta mala palatabilidad de la soja había sido encontrada también en trabajos previos por otros autores (FOWLER y BANKS, 1967; FOWLER, 1980). Según MURAI et al. (1989), el tratamiento de los productos de la soja con metanol reduce este problema de mala palatabilidad.

Por otra parte, los buenos niveles de ingesta encontrados para las dietas con harina de altramuz en el presente experimento concuerdan con aquellos descritos previamente en salmónidos (DE LA HIGUERA et al., 1988; GOMES y KAUSHIK, 1989a; HUGHES, 1991; MOYANO, 1990). En contraste con la harina de soja hay que reseñar, (LIENER, 1980), que los factores antinutricionales de la harina de altramuz que podrían afectar a la mala palatabilidad de la misma por los peces (principalmente alcaloides) son hidrosolubles y se eliminan fácilmente. Atendiendo a todo esto, la evaluación nutricional de ambas proteínas vegetales no estuvo condicionada por una reducción en la ingesta alimenticia de los peces sometidos a los diferentes tratamientos experimentales.

En cuanto al crecimiento, aunque no se encontraron diferencias significativas, se observó una reducción global de éste a medida que se incrementó el nivel de proteína vegetal en las dietas, lo cual pudo ser debido a diferentes factores, entre ellos factores antinutricionales que

pueden limitar el uso de elevados niveles de ingredientes vegetales en dietas para peces (CHUBB, 1982; RICHARDSON et al., 1985; GATLIN y PHILLIPS, 1989). En este sentido, en el caso de los tratamientos con soja se tuvo que el nivel máximo permisible de sustitución por esta fuente proteica, con las condiciones experimentales de este trabajo, fue del 20%. Este resultado se contrapone al 30% encontrado en piensos para seriola (LEE et al., 1991; VIYEKARN et al., 1992; SHIMENO et al., 1992), y al 40% determinado para platija (COWEY et al., 1971). Por otro lado, los buenos resultados obtenidos para los piensos con harina de semillas de altramuз concuerdan con aquellos mostrados por MOYANO (1990) para trucha arco iris, quien encontró que el óptimo nivel de sustitución para esta especie era del 30%, si bien posteriormente, MORALES (1993) llegó a conseguir resultados satisfactorios desde el punto de vista productivo con sustituciones del 40% de la proteína de pescado por proteína de altramuз en piensos para esa misma especie.

Según los resultados de FE, PER y PPV, el valor nutricional de ambas proteínas vegetales es semejante. No obstante, se pudo observar en conjunto una reducción en ese valor conforme el nivel de harina de soja se incrementaba en la dieta, aunque no fueron detectadas diferencias significativas entre las dietas de cada serie. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por ALLIOT et al. (1979) para lubinas y SHIMENO et al. (1992, 1993) para seriola.

Un resultado que merece especial mención es el elevado PPV que se obtuvo para los peces alimentados con los tratamientos A20 y A30, los cuales estarían relacionados con el mayor porcentaje en proteínas corporales encontrado para estos peces. La explicación de estos valores de PPV tan altos no se puede hacer en función de la calidad proteica del altramuз, en relación a su composición en aminoácidos esenciales, puesto que aunque presenta una elevada proporción en lisina, es pobre en aminoácidos sulfurados. Según MOYANO (1990), coincidiendo con la hipótesis emitida por HUGHES, (1985), la explicación a los sorprendentemente buenos resultados encontrados para el altramuз en piensos para trucha podría estar relacionada con la capacidad del animal para utilizar eficientemente el aminoácido glutámico contenido en altas proporciones en esta materia prima (20-25% de la proteína), como fuente de aminoácidos no esenciales.

Se sabe que una gran parte de la proteína dietaria es utilizada por los peces con fines energéticos, existiendo una cierta predisposición de los mismos a utilizar las cadenas

carbonadas de los aminoácidos como sustrato energético. En este sentido, la existencia en la dieta de una elevada proporción de glutámico podría representar un "ahorro" importante en la síntesis de aminoácidos no esenciales, pudiendo además ser utilizado para la síntesis de ácidos grasos y para el engorde. Así un alto contenido en glutámico en la proteína podría contribuir a un mejor aprovechamiento general de la energía dietaria.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la harina de altramuç contiene otros nutrientes energéticos, lípidos y carbohidratos, cuya buena calidad nutritiva podría favorecer la deposición de proteínas.

En cuanto a las actividades enzimáticas, se encontró una reducción significativa de la actividad de las tripsinas a medida que se incrementaba el contenido en harina de soja, lo cual no puede ser explicado en este caso por la presencia de inhibidores tripsicos en la soja, ya que como resultado de la analítica previa, la presencia de este tipo de inhibidores fue descartada. En el caso de los tratamientos con harina de altramuç también fue encontrada esta disminución de la actividad tripsica a medida que la incorporación de harina de altramuç en el pienso aumentaba; estos resultados podrían sugerir, comparados con los obtenidos para la dieta control, la presencia de algún tipo de inhibidor de tripsinas en la harina de altramuç. Sin embargo, no ha sido notificada la existencia en el altramuç de ningún factor antitripsico. En el caso de los peces alimentados con soja, la reducción de la actividad enzimática puede haber estado asociada con la presencia de otro tipo de factores antinutritivos generalmente presentes en esta materia prima vegetal, los fitatos, los cuales pueden afectar entre otras cosas a la utilización de la proteína de las dietas. RICHARDSON et al. (1985), encontraron que niveles elevados de este ácido en piensos para salmones producía una reducción del crecimiento, conversión alimenticia y utilización de las proteínas. Este tipo de compuestos no son utilizables por la mayoría de los peces y animales monogástricos terrestres, debido a la ausencia en estos organismos del enzima fitasa, que cataliza la conversión de los fitatos en sustancias disponibles más simples. Teniendo en cuenta que la harina de soja tiene aproximadamente un 75% del fósforo en la forma de ácido fitico (1.0-1.5% del harina), es posible que la disponibilidad del fósforo disminuya a medida que el nivel de harina de soja se incremente en los piensos experimentales.

Por otro lado, el incremento en las deposiciones lipídicas en hígado y músculo, así como la disminución en el contenido de glucógeno en el hígado, han sido señalados como signos

de deficiencia de fósforo en peces (SAKAMOTO y YONE, 1978; SAKAMOTO, 1981). Estas observaciones estarían de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el análisis histológico de los hígados de los peces alimentados con los niveles más altos de soja en las dietas mostraron mayores deposiciones lipídicas junto con una disminución en los depósitos de glucógeno.

El hecho de que las inclusiones crecientes de soja en las dietas no viniesen acompañadas por un aumento en los índices hepatosomáticos de los peces sometidos a esos tratamientos, podría estar relacionado con el incremento en el grado de degeneración del tejido hepático observado en estos peces. Estos resultados según MOSCONI-BAC (1987, 1990) supondrían algo más que un mero proceso reversible reflejo de una desviación en el metabolismo de los ácidos grasos.

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en lípidos en carcasa total concuerdan con los descritos por SHIMENO et al. (1993), que no encontraron un efecto significativo de los altos niveles de inclusión de harina de soja en las dietas para seriola.

Por otra parte las lectinas o aglutininas, proteínas presentes en las semillas de soja que tienen la capacidad de aglutinar heritrocitos, pueden formar precipitados con polisacáridos y oligosacáridos (NIELSEN, 1985; HENDRIKS et al., 1990), reduciendo aún más su disponibilidad. Por otro lado, HENDRIKS et al. (1990) encontraron como característica adicional de las aglutininas de la soja (SBA), la capacidad de unión de las mismas a la membrana del borde piloso o células en cepillo de los enterocitos en salmones, dificultando de así la adecuada absorción de los nutrientes. De esta forma, aparte de los inhibidores proteásicos, estas SBA pudieran también contribuir al efecto perjudicial de los productos de soja en dietas para peces.

Además de los factores anteriormente citados para la soja, conviene resaltar el hecho de que algunos oligosacáridos y almidones pueden ser considerados incorrectamente como carbohidratos disponibles, como ha sido mostrado en el caso de la soja y el altramuza (SAINI, 1989), los cuales dificultan la utilización de otros nutrientes. De hecho, una disminución en el uso de nutrientes como las proteínas, como consecuencia de los carbohidratos presentes en la soja ha sido encontrada en salmónidos (ARNESEN et al., 1989). COWEY et al. (1971),

también relacionaron la mala utilización de la soja en dietas para para platija con los carbohidratos complejos presentes en este ingrediente, los cuales pueden resistir la hidrólisis enzimática en el tracto digestivo y afectar adversamente a la digestibilidad de las proteínas.

En conclusión, el tipo o nivel de proteína vegetal con que se alimentó a los peces en este experimento no afectó de manera significativa al crecimiento o a la utilización nutritiva de las dietas. Sin embargo, en el caso de los hígados de los peces alimentados con las dietas que contenían harina de soja, fueron observadas diferencias histológicas notables con respecto a los peces alimentados tanto con la dieta control, como con las dietas que contuvieron harina de altramuces. Ello pondría en tela de juicio la capacidad de utilización de la harina de soja a niveles altos de inclusión, durante largos períodos, en dietas para dorada.

3.3. EXPERIMENTO 2. GLUTEN DE MAÍZ Y HARINA DE CARNE Y HUESOS.

3.3.1. INTRODUCCION.

El uso de la harina de **gluten de maíz** como única fuente de proteína en alimentos para peces no es muy común (TACON y JACKSON, 1985). Han sido encontrados índices de crecimiento bajos en dietas conteniendo únicamente harina de gluten de maíz como fuente proteica, en alevines de **salmón blanco**, *Chanos chanos* (SENERICHES y CHIU, 1988) y en **trucha arco iris** (KETOLA, 1982), incluso suplementando las dietas con los aminoácidos que podían ser limitantes. También en carpas ha sido comprobado que la sustitución total de la harina de pescado por gluten de maíz daba peores resultados de crecimiento y utilización del alimento (PONGMANEERAT y WATANABE, 1991).

Por el contrario, ha sido reflejada en diferentes trabajos la buena utilización de la harina de gluten de maíz como sustituto parcial de la harina de pescado en piensos para peces. De acuerdo con ALEXIS et al. (1985) y FAUCONNEAU (1988), se obtienen buenos resultados de crecimiento y utilización del alimento con niveles del 12 al 20% de harina de gluten de maíz en dietas para engorde de **trucha**, mientras que según GROPP et al. (1979) con un 25% de sustitución de la harina de pescado por gluten de maíz también se obtuvieron resultados satisfactorios. Más aún, para esta misma especie MOYANO et al. (1992), demostraron que incluso reemplazando hasta un 40% de la harina de pescado por gluten de maíz en los piensos no se observaron efectos negativos sobre el crecimiento, aceptación y conversión del alimento. Por otra parte, las propiedades organolépticas de los peces no se vieron afectadas por la alimentación con este tipo de piensos en comparación con los controles formulados con harina de pescado (MOYANO, 1990).

Por el contrario, en el caso de dietas para juveniles de **seriola**, sustituciones de más de un 10% de la harina de pescado por gluten de maíz en el pienso resultaron en una disminución del crecimiento y la eficacia alimenticia con respecto a una dieta control de pescado.

En juveniles de **lubina**, ALLIOT et al. (1979) obtuvieron que sustituciones de hasta un 20% de la harina de pescado por harina de gluten de maíz no afectaron prácticamente al crecimiento y factor de conversión de las dietas.

Por otro lado, diferentes autores han encontrado mejores resultados de crecimiento y utilización nutritiva de las dietas mezclando en diferente proporción el gluten de maíz con otras fuentes proteicas de origen vegetal. Así, según GOMES et al. (1994), niveles de sustitución de hasta un 50% de la harina de pescado por una mezcla de harinas de soja y gluten de maíz en piensos trucha arco iris dieron resultados similares de utilización del alimento frente al control con harina de pescado. Estos valores se contraponen a los previamente obtenidos por PONGMANEERAT y WATANABE (1992), quienes habían encontrado que el mejor nivel de sustitución era del 40% siendo la relación 25% de soja-15% de gluten la más efectiva a la hora de encontrar una sustitución óptima de la harina de pescado en piensos para trucha arco iris.

En el caso de la **harina de carne y huesos**, los resultados obtenidos en dietas para peces varían entre unas especies y otras, dando en general a niveles de inclusión muy altos, malos resultados de crecimiento y utilización del alimento en **trucha** arco iris (WATANABE y PONGMANEERAT, 1991), y en **carpa** (PONGMANEERAT y WATANABE, 1991), y buenos en **tilapia** (DAVIES et al., 1989).

Si bien LANGAR y METAILLER (1989) obtuvieron buenos resultados de crecimiento y conversión alimenticia para **lubina**, con niveles de hasta el 30% de la proteína dietaria proveniente de harina de carne, no hay suficiente información disponible para **dorada**.

3.3.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Los ingredientes proteicos alternativos a la harina de pescado usados en este experimento fueron harina de gluten de maíz, proporcionada por la empresa CAMPOEBRO INDUSTRIAL, S.A., y harina de carne y huesos, obtenida a nivel local. No se consideró necesario ningún tipo de tratamiento de los ingredientes antes de su inclusión en las dietas. Las composiciones de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos a ensayar en el presente experimento aparecen en la Tabla 15.

Tabla 15. Composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos experimentales con harinas de gluten de maíz y carne y huesos (g/100 g peso seco).

INGREDIENTES	HARINA DE PESCADO	HARINA DE GLUTEN DE MAIZ	HARINA DE CARNE Y HUESOS
Proteínas	74.69	85.37	64.09
Lípidos	7.72	2.57	10.31
Ceniza	16.38	1.34	25.42
Humedad	7.75	10.28	7.68

En este caso también fueron formulados dos grupos de dietas experimentales, en las que se sustituyó la proteína de la harina de pescado por proteínas de gluten de maíz o de carne y huesos a niveles de 20, 30 ó 40% (Tabla 16), asignándosele a cada una de ellas una clave con la inicial del ingrediente proteico alternativo seguido por el nivel de sustitución del mismo:

G20, G30 y G40 para el gluten de maíz.

M20, M30 y M40 para la harina de carne y huesos.

Estos niveles de inclusión de las fuentes de proteína sustitutorias de la proteína de pescado usados en este experimento son superiores a los del experimento anterior, en base a los buenos resultados obtenidos con los mismos en varias especies estudiadas por otros autores, debidos principalmente a un contenido más apropiado de aminoácidos en estos ingredientes. La Tabla 16 muestra la formulación y composición de las diferentes dietas experimentales ensayadas. La composición en aminoácidos esenciales calculada para cada uno de los tratamientos, junto con el perfil de aminoácidos en carcasa de dorada se muestran en la Tabla 17. Por otro lado, la Tabla 18 presenta el cómputo químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de cada una de las dietas ensayadas, frente a las necesidades en aminoácidos esenciales para dorada.

Tabla 16. Formulación y composición de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.

INGREDIENTES (% peso húmedo)	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Harina de pescado	60.25	48.20	42.17	36.17	48.20	42.17	36.17
Harina de gluten de maíz	-	10.54	15.81	21.08	-	-	-
Harina de carne y huesos	-	-	-	-	14.04	21.06	28.09
Aceite de pescado	7.35	8.29	8.74	9.21	8.29	8.74	9.21
Almidón de maíz	16.15	16.15	16.15	16.15	16.15	16.15	16.15
Dextrina	5.38	5.38	5.38	5.38	5.38	5.38	5.38
Vitaminas ¹	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Minerales ²	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
CMC ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α -Celulosa	6.37	6.94	7.25	7.51	3.44	2.00	0.50
COMPOSICION (% peso seco)							
Humedad	7.54	6.10	4.78	6.86	5.61	6.73	6.34
Proteínas	44.34	45.17	42.80	42.69	43.89	41.95	43.85
Lípidos	11.35	10.99	10.50	11.71	13.14	14.11	14.81
Ceniza	12.43	10.73	8.86	7.35	13.92	15.71	16.66
Fibra	6.59	7.49	7.75	6.35	4.29	3.35	2.03
Carbohidratos ⁴	25.29	25.62	30.09	31.90	24.76	24.88	22.65
Energía bruta (Kj/g)	18.12	17.55	17.47	17.89	17.87	17.10	17.54

(1) y (2) Composición de las mezclas en la Tabla 7.

(3) Carboximetil celulosa.

(4) Calculados por diferencia (100-resto ingredientes).

Tabla 17. Composición en aminoácidos esenciales calculados para las dietas experimentales con harinas de gluten de maíz y carne y huesos (expresados en % de la proteína).

	AA*	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Arg	4.33	5.80	5.17	4.85	4.54	5.99	6.09	6.19
His	1.82	2.74	2.44	2.29	2.14	2.51	2.40	2.28
Ile	3.76	2.74	2.68	2.65	2.62	2.83	2.87	2.92
Leu	5.24	6.84	7.41	7.70	7.99	6.43	6.23	6.02
Lys	5.49	6.84	5.73	5.17	4.62	6.43	6.23	6.02
Met	2.00	2.74	2.44	2.29	2.14	2.51	2.40	2.28
Phe	2.53	2.74	2.92	3.01	3.10	2.83	2.87	2.92
Thr	3.69	4.10	3.77	3.61	3.44	3.92	3.83	3.74
Trp	0.50	1.37	1.10	0.96	0.83	1.09	0.96	0.82
Val	3.27	2.74	2.68	2.65	2.62	3.15	3.35	3.56

* Necesidades en aminoácidos para dorada calculados en base a la composición corporal de la misma (VERGARA, 1992).

Tabla 18. Cómputo químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de cada una de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de gluten de maíz y carne y huesos, frente a las necesidades de AAE para dorada.

	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Cómputo químico	72.70	71.09	70.29	69.50	75.06	76.13	77.45
% deficiencia	27.30	28.91	29.71	30.50	24.94	23.87	22.55
Primer AAE limitante	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile

Para llevar a cabo este ensayo se dispuso de juveniles de doradas de unos 40g de peso medio inicial, que fueron anestesiados, pesados y repartidos al azar en grupos de 15 peces por tanque, después de un período de aclimatación de una semana en un tanque de 1000 l, en el que se les alimentó "ad libitum" con la dieta control.

Los tanques fueron provistos de flujo continuo (1 l/min) de agua de mar ($19.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$), y los peces fueron alimentados hasta la saciedad cuatro veces al día (09:00, 12:00, 15:00 y 18:00), manteniendo un fotoperíodo constante de 12 h luz/12 h oscuridad. El valor medio de pH medido a lo largo del experimento fue de 8.06 ± 0.05 . La duración del presente ensayo fue de 90 días.

3.3.3. RESULTADOS.

CRECIMIENTO Y UTILIZACION DEL ALIMENTO.

También en este caso la aceptación de las dietas fue buena, no observándose mortalidad durante el período experimental. La media de ingest  n diaria del alimento osciló entre 1.27 y 1.42 g/100g de pez. En general no se observó un efecto significativo de la fuente proteica alternativa sobre la ingest  n total de las dietas (Tabla 19), con la excepción de las obtenidas para la dieta con mayor nivel de sustitución de gluten de maíz (G40), que resultó mayor que las de las dietas con un 30 y 40% de sustitución por harina de carne y huesos. Comparando

entre ambos grupos de dietas se podría decir que para igual nivel de sustitución, las ingestas totales de las dietas con gluten de maíz fueron relativamente superiores a las de harina de carne y huesos. En el caso de las ingestas proteicas únicamente la de los peces alimentados con el tratamiento M30 fue claramente menor que la observada para cualquiera de los piensos que incluyeron harina de gluten.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los peces alimentados con los distintos piensos experimentales (Fig. 12). La efectividad de las distintas fórmulas para producir crecimiento, valorada por el índice de eficacia alimenticia, mostró gran homogeneidad entre los distintos grupos experimentales. Resultados similares se obtuvieron en relación con el coeficiente de eficacia proteica, aunque en este caso los valores obtenidos para los tratamientos M30 y M40 fueron significativamente mejores que para la G40. Por el contrario, el aprovechamiento de la proteína medido por el PPV no mostró diferencias estadísticas para los diferentes piensos experimentales, ocurriendo lo mismo para los HSI de los peces.

Tabla 19. Crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y de la proteína e índice hepatosomático para los piensos experimentales con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.

	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Peso medio inicial (g)	41.06 ^a ±2.44	40.93 ^a ±2.80	40.74 ^a ±3.02	41.45 ^a ±2.55	41.70 ^a ±2.57	40.50 ^a ±2.62	40.41 ^a ±2.77
Peso medio final (g)	83.39 ^a ±4.23	82.15 ^a ±4.40	84.03 ^a ±0.97	83.54 ^a ±2.95	86.10 ^a ±5.20	80.62 ^a ±2.49	82.82 ^a ±1.99
Incremento peso (% peso inicial)	103.10 ^a ±10.24	101.77 ^a ±8.10	106.26 ^a ±6.90	101.53 ^a ±4.99	106.46 ^a ±12.43	99.10 ^a ±6.00	104.91 ^a ±1.54
Ingesta total (g)	1024.73 ^{ab} ±32.97	1029.87 ^{ab} ±36.98	1061.50 ^{ab} ±31.14	1177.97 ^b ±39.13	1038.53 ^{ab} ±98.37	936.60 ^a ±79.19	985.30 ^a ±43.25
Ingesta proteica (g)	422.52 ^{ab} ±13.59	438.41 ^b ±15.74	433.62 ^b ±12.74	470.60 ^b ±15.73	431.62 ^{ab} ±40.88	368.08 ^a ±31.12	406.34 ^{ab} ±17.84
FE	0.67 ^a ±0.05	0.64 ^a ±0.05	0.64 ^a ±0.03	0.58 ^a ±0.05	0.68 ^a ±0.02	0.69 ^a ±0.04	0.69 ^a ±0.04
PER	1.40 ^{ab} ±0.10	1.34 ^{ab} ±0.10	1.43 ^{ab} ±0.07	1.26 ^a ±0.10	1.46 ^{ab} ±0.05	1.54 ^b ±0.08	1.48 ^b ±0.09
PPV	25.36 ^a ±1.64	23.36 ^a ±1.95	24.67 ^a ±1.22	21.96 ^a ±1.79	24.83 ^a ±0.82	25.38 ^a ±1.30	25.57 ^a ±1.57
HSI	1.49 ^a ±0.21	1.97 ^a ±0.23	1.81 ^a ±0.12	1.75 ^a ±0.49	1.96 ^a ±0.31	1.88 ^a ±0.20	1.74 ^a ±0.18

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

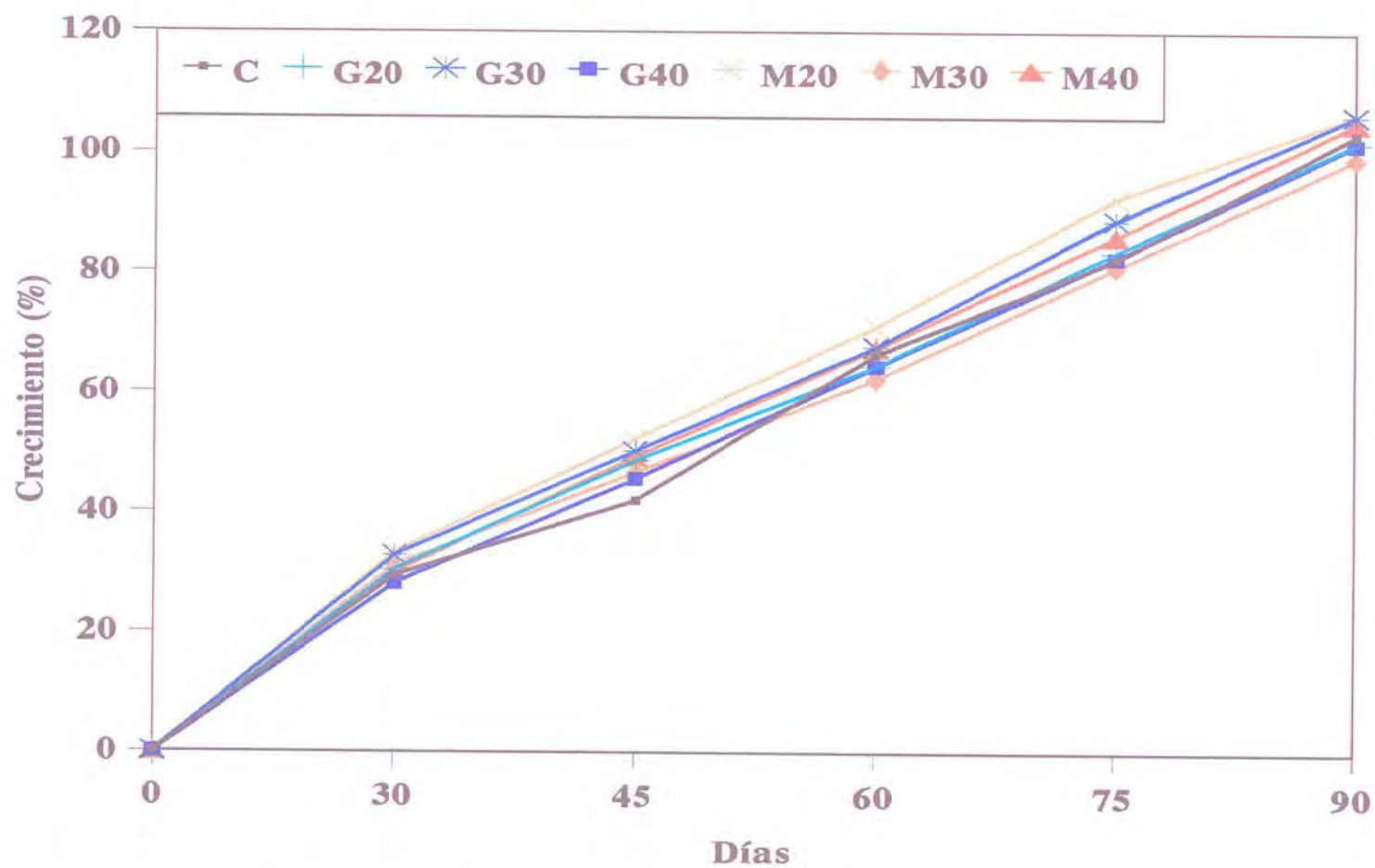


Fig. 12. Incremento de peso (% sobre el peso inicial).

COMPOSICION CORPORAL DE LOS PECES.

La Tabla 20 muestra la composición corporal de los peces al final del período experimental. Tanto la composición en proteína, como en lípidos, cenizas y humedad de los peces no se vió influenciada por el nivel o tipo de ingrediente alternativo a la harina de pescado utilizados en las dietas.

Comparando entre las dietas de un mismo grupo, únicamente los peces alimentados con las dietas a base de harina de carne y huesos muestran una tendencia, aunque no significativa, a aumentar los niveles de proteínas, ceniza y humedad y a disminuir los lípidos a medida que aumentó la proporción de este ingrediente en la dieta.

En cuanto a la retención energética observada para los peces alimentados con los distintos piensos, a nivel general se tuvo que aquellos obtenidos para los tratamientos que incluyeron harina de carne y huesos fueron relativamente superiores al resto, siendo significativamente mayores para los peces alimentados con las dietas M20 y M30 con respecto a los que fueron tratados con G40.

Un aspecto a considerar en cuanto a los peces alimentados con dietas en las que se incluyó gluten de maíz, fue la aparición de un peculiar color amarillo-anaranjado en los opérculos y bases de las aletas, cuya intensidad aumentó con el incremento de gluten en la dieta. Esta especial coloración no se encontró para los peces alimentados con el resto de los tratamientos, incluido el control.

Tabla 20. Composición corporal y tasa de retención energética de los peces utilizados en el experimento con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.

COMPOSICION (% peso seco)	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Proteínas	57.53 ^a ±2.13	55.87 ^a ±1.84	53.99 ^a ±0.14	56.04 ^a ±0.50	54.61 ^a ±1.51	55.80 ^a ±1.54	56.43 ^a ±1.21
Lípidos	27.16 ^a ±2.09	29.35 ^a ±0.74	30.74 ^a ±0.50	29.68 ^a ±1.95	30.21 ^a ±1.30	29.77 ^a ±1.08	28.07 ^a ±1.75
Ceniza	12.54 ^a ±0.23	12.47 ^a ±0.36	11.69 ^a ±0.25	12.10 ^a ±0.44	11.92 ^a ±0.50	12.58 ^a ±0.05	12.71 ^a ±0.49
Humedad	69.27 ^a ±0.21	68.84 ^a ±0.79	68.12 ^a ±0.51	69.10 ^a ±0.51	68.73 ^a ±0.73	68.90 ^a ±0.33	69.42 ^a ±0.57
RETENCION ENERGETICA (%)	27.66 ^{ab} ±1.81	28.74 ^{ab} ±2.28	30.86 ^b ±1.40	25.27 ^a ±2.02	30.50 ^b ±0.93	31.92 ^b ±1.69	29.35 ^{ab} ±1.80

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

De igual forma que en el Exp. con harinas de soja y de altramuiz, las muestras de los hígados de los peces alimentados con las dietas que contuvieron las proteínas alternativas fueron comparadas con aquellas de la dieta control, las cuales no presentaron, tampoco en este caso, ninguna alteración con respecto a una histología normal (Fig. 7).

En el caso de las dietas con gluten de maíz no fueron encontradas alteraciones histológicas incluso a niveles del 40% de sustitución, destacando un aumento del tamaño celular conforme se incrementaba el porcentaje de esta harina en el pienso, pero sin producir alteraciones ni deposiciones de origen lipídico apreciable (Figs. 13 y 14). Por el contrario, niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de harina de carne y huesos igual o superior al 30%, sí que dieron lugar a alteraciones hepáticas notables, encontrándose principalmente migración de núcleos en los hepatocitos y algunas zonas con pequeños focos degenerativos para un 40% de sustitución. En este caso, también se observaron grandes acúmulos de grasa en el tejido peripancreático (Figs. 15 y 16).

Por otro lado, los peces alimentados con la dieta control se caracterizaron por presentar hepatocitos con gran afinidad al PAS. También se observó en general una reacción PAS positiva más acusada en los peces alimentados con harina de gluten de maíz que en aquellos alimentados con las dietas que incluyeron harina de carne y huesos. Además, tanto para uno u otro grupo de dietas, un aumento en el nivel de inclusión de ambas harinas vino acompañado por una reducción en el glucógeno hepático.

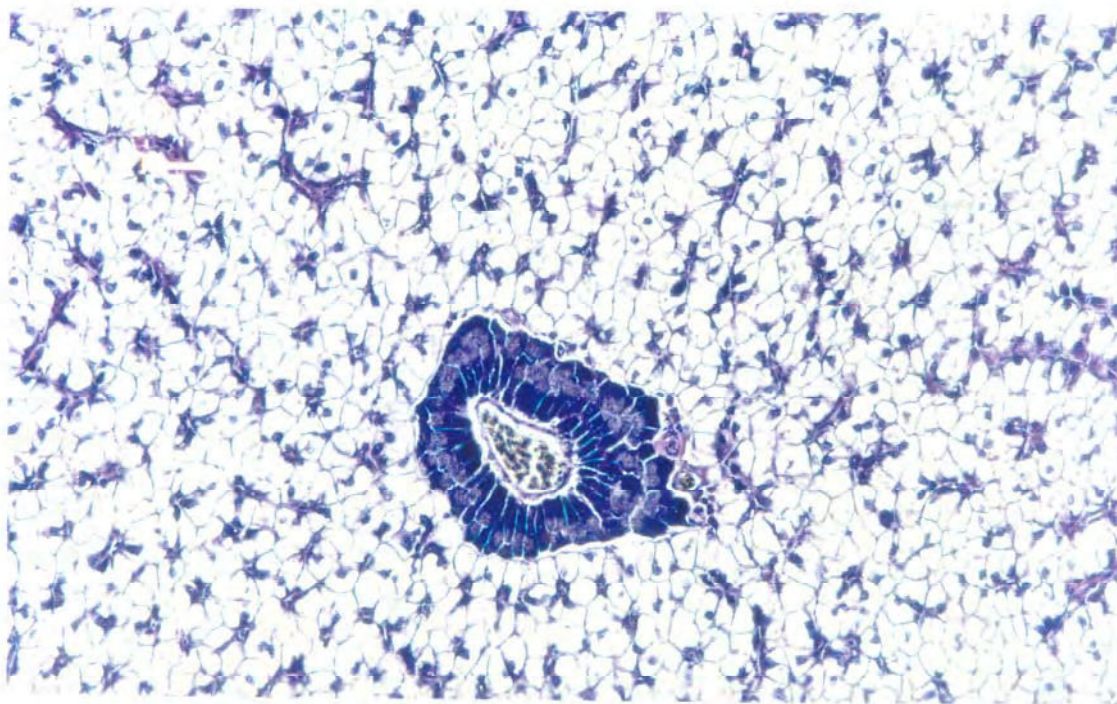


Fig. 13. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta G30.

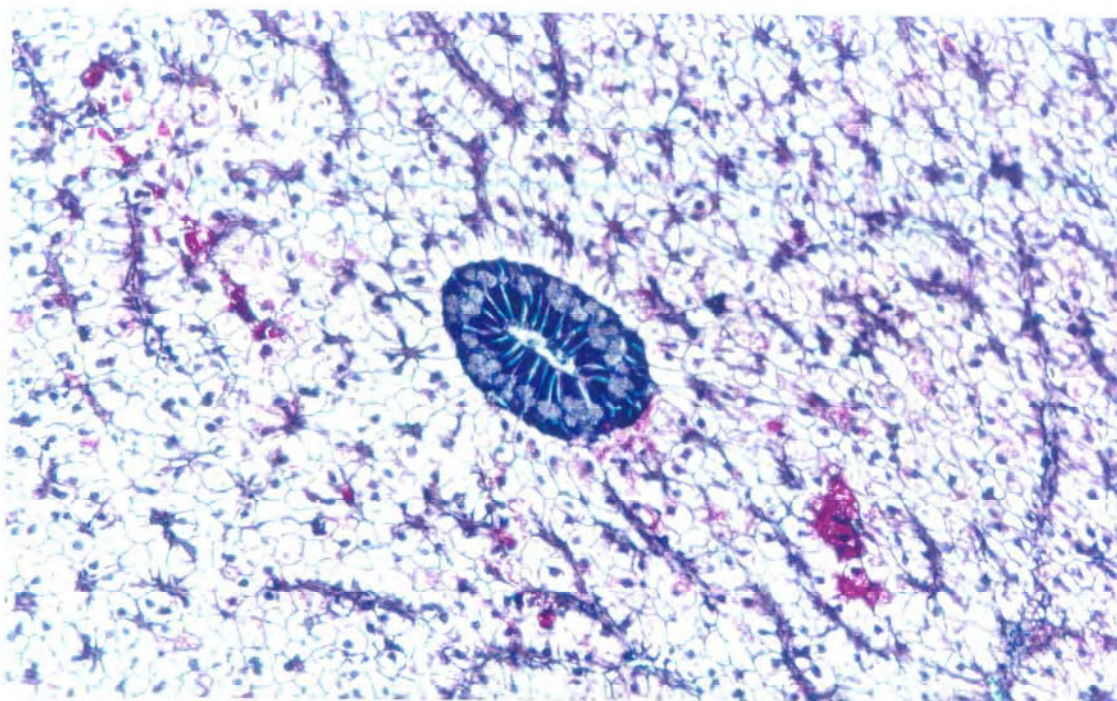


Fig. 14. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta G40.

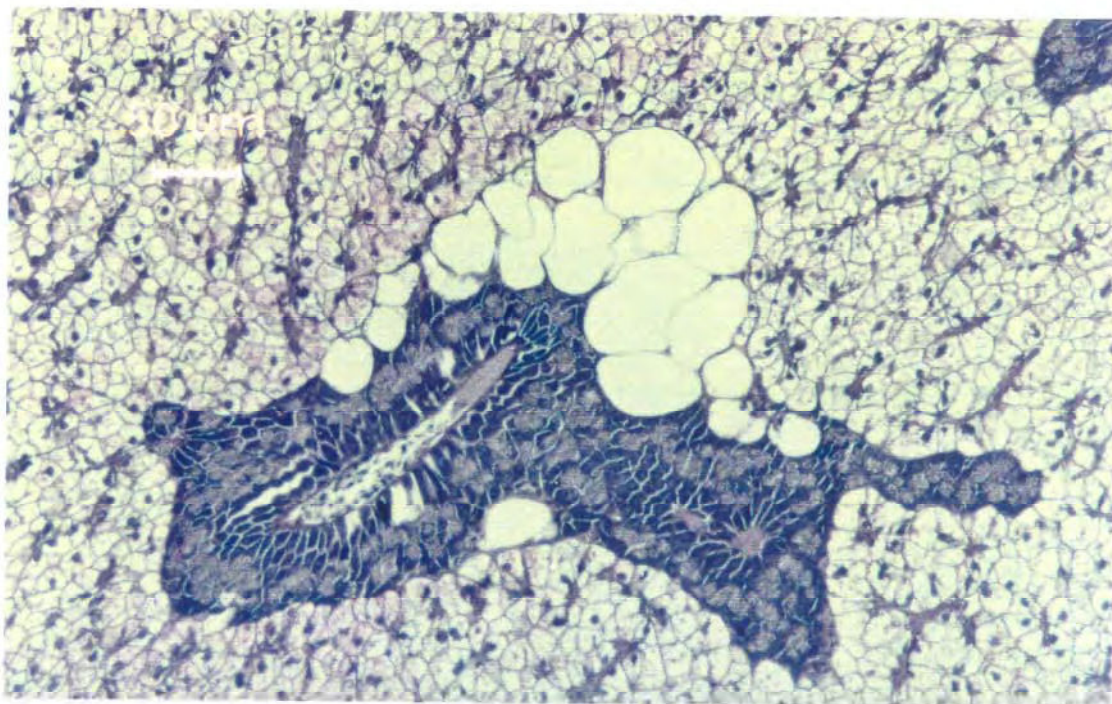


Fig. 15. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta M30.

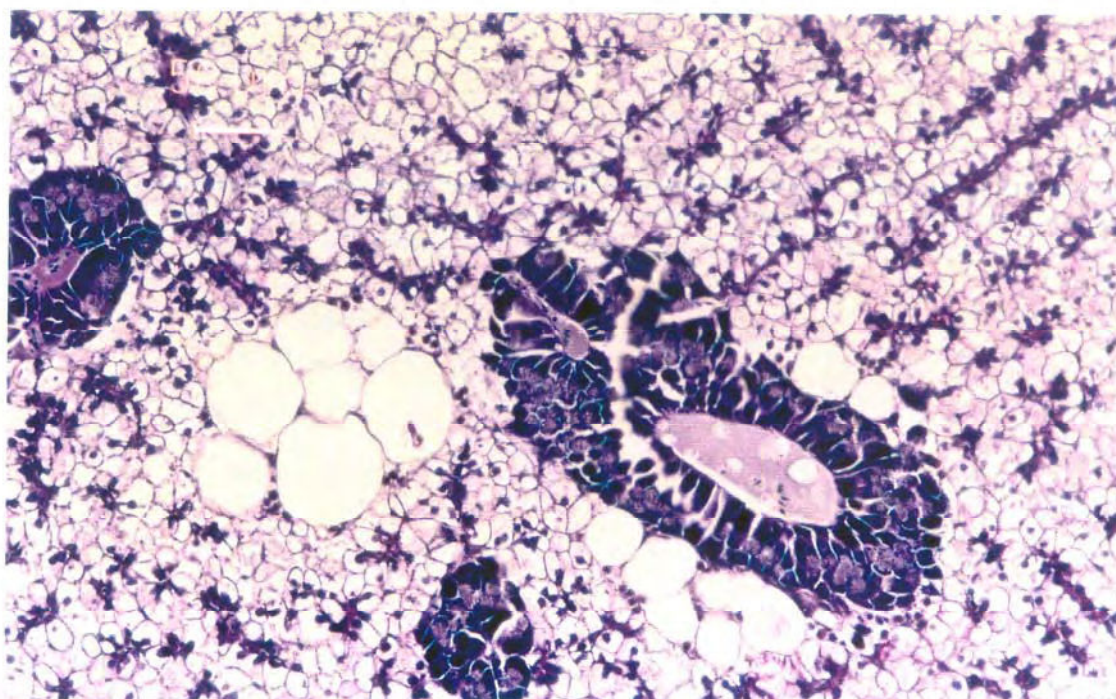


Fig. 16. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta M40.

3.3.4. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los óptimos resultados obtenidos en cuanto a la ingestión de las dietas indican la buena aceptación de los ingredientes proteicos alternativos ensayados, tal como ya ha sido descrito para otras especies (MOYANO, 1990; DAVIES et al., 1990). El incremento de la ingestión total observado con la inclusión creciente de gluten de maíz podría estar relacionada con una disminución en la misma de la energía digestible, como consecuencia del aumento de carbohidratos parcialmente digestibles procedentes del gluten de maíz, que se corresponde con el incremento en el contenido de carbohidratos de esas dietas (Tabla 16). Son muchos los autores que suponen a los peces capaces de controlar los niveles de ingestión dietaria en función del contenido calórico de la misma (ROZIN y MAYER, 1961; GROVE et al., 1978; MARAIS y KISSIL, 1979; WEISBERG y LOTRICH, 1982), aunque otros autores como CHO y KAUSHIK (1985) manifiestan que el verdadero factor determinante de la autorregulación de la ingesta es el nivel de energía digestible, y no el de energía bruta del alimento.

A pesar de estas diferencias encontradas en las tasas de ingesta, el hecho de que los resultados de crecimiento fueran semejantes para todas las dietas, pudiera ser reflejo de la buena utilización del alimento una vez éste ha sido absorbido del tracto gastrointestinal, sobre todo en el caso de los tratamientos que incluyeron harina de carne y huesos. Ello queda reflejado en la homogeneidad de resultados en relación a la eficacia del alimento obtenidos para las distintas fórmulas ensayadas.

Aunque sin presentar diferencias con la dieta control, los menores valores de PER encontrados en los peces alimentados con un nivel de sustitución del 40% de la proteína de pescado por gluten de maíz, respecto a los alimentados con niveles del 30 y 40% de harina de carne y huesos, reflejan las mayores ingestas observadas para la primera, sugiriendo también en este caso una utilización nutritiva del alimento ligeramente superior para los piensos que incluyen harina de carne y huesos. Esta hipótesis resulta mucho más evidente si comparamos las ingestas proteicas de los peces alimentados con las dietas de gluten de maíz con respecto a las de carne y huesos. De este modo se tiene que, aunque a nivel general y significativamente para la dieta M30, las ingestas proteicas en gramos fueron menores para los peces sometidos a las fórmulas con harina de carne y huesos en relación a las que

incluyeron gluten de maíz, los valores de aprovechamiento proteico medidos por el PPV resultaron muy homogéneos para los distintos tratamientos. Todo ello podría estar relacionado con un perfil de aminoácidos menos adecuado a las necesidades de esta especie en las dietas con mayor nivel de sustitución de gluten de maíz. Así tenemos que, niveles crecientes de gluten de maíz en las fórmulas traen consigo una composición en aminoácidos esenciales reducida en isoleucina, lisina, treonina y valina, mientras que los niveles más altos de inclusión de harina de carne y huesos sólo presentaron defecto de isoleucina (Tabla 17). Aún con todo esto, el crecimiento de los peces no se vió afectado por los niveles crecientes de gluten en el pienso lo que podría estar relacionado, como en el caso de la harina de altramuza, con el elevado contenido en el aminoácido glutámico de esta harina el cual, según la explicación detallada en el Apdo. 3.2.4. podría influir en el "ahorro" energético de la síntesis de aminoácidos no esenciales a partir de los esenciales.

Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos para seriola (SHIMENO et al., 1993) en los que para un mismo nivel de sustitución, la harina de carne y huesos dió mejores resultados de utilización de la dieta que el gluten de maíz, siendo recomendados unos niveles máximos de inclusión en la dieta del 10% para el gluten y del 20% para la harina de carne y huesos. En general, de la revisión bibliográfica previa (Apdo. 3.3.1) se puede deducir una mejor conveniencia del uso de la harina de carne y huesos frente al gluten de maíz. Así tenemos que para el gluten son recomendados niveles de un 20-25% (GROPP et al., 1979; ALEXIS et al., 1985; FAUCONNEAU, 1988) e incluso un 40% (MOYANO, 1990; MORALES, 1993) en dietas para trucha arco iris; y un 20% en dietas para lubinas (ALLIOT et al., 1979), mientras que para la harina de carne se recomiendan niveles de hasta un 75% para tilapia (DAVIES et al., 1989).

En el caso concreto de la dorada, los resultados del presente experimento concuerdan con los de DAVIES et al. (1991), quienes sustituyeron un 38% de la proteína de pescado por proteína de harina de carne y huesos en dietas para alevines de 5 g sin obtener alteraciones en el crecimiento y utilización nutritiva del alimento respecto a los peces alimentados con un control sólo con harina de pescado.

Por otra parte, no se encontró una influencia clara del contenido en proteína de gluten y carne de las dietas sobre la composición corporal de los animales. No obstante, los peces

alimentados con niveles crecientes de harina de carne y huesos mostraron un aumento del contenido corporal en proteínas y cenizas a expensas del contenido en lípidos. Esto estaría de acuerdo con los valores más altos de utilización proteica obtenidos para estas dietas con respecto a las dietas que incluyeron gluten de maíz, lo cual podría estar también relacionado con el mejor o más adecuado perfil de aminoácidos de esas dietas. En cuanto a los piensos que incluyeron gluten de maíz, no se observó una disminución significativa en el contenido de lípidos de los peces al incrementar la inclusión de dicho ingrediente, tal como ha sido descrita por SHIMENO et al. (1993) para juveniles de *seriola*. Esta diferencia, posiblemente, es debida al mayor contenido lipídico, proteico y energético en las dietas experimentales para *seriola* y especialmente en un mayor contenido de lípidos proveniente del gluten de maíz y, por lo tanto, no esenciales para peces marinos.

Los estudios histológicos realizados en el presente experimento indican una mayor deposición de lípidos y menor de glucógeno en los hígados de los peces alimentados con los tratamientos que incluyeron harina de carne y huesos. Esto podría estar relacionado con un desequilibrio entre los ácidos grasos saturados e insaturados, como consecuencia del elevado contenido en grasas saturadas de esta harina. Estos resultados concuerdan con aquellos de SHIMENO et al. (1993) para *seriola*, quienes encontraron un mayor contenido de lípidos en los hígados de peces alimentados con harina de carne y huesos que en aquellos alimentados con harina de gluten de maíz. Por otro lado, se pudo apreciar también la presencia en los cortes histológicos de los hígados de focos necróticos puntuales indicativos, según MOSCONI-BAC (1987, 1990), de posibles efectos irreversibles sobre la salud de los peces originados por desequilibrios en el alimento.

Por último, una observación que merece especial mención es la coloración amarillo-anaranjada que apareció, principalmente a nivel de opérculos y aletas, en los peces alimentados con las dietas que incluyeron gluten de maíz. Esto pudiera estar relacionado con la presencia de algún carotenoide del tipo de las xantofilas presente en la harina de gluten principalmente la zeaxantina y la luteína que son los que producen ese característico color amarillento (LATSCHA, 1990). Muchos peces son selectores de xantofilas, siendo éste el principal carotenoide presente en su alimento natural (TACON, 1981). Diferentes estudios indican que los carotenoides dietarios producen coloración amarillenta en el músculo y piel de los peces, relacionándose de forma lineal la intensidad de coloración con el contenido en

carotenoides en la dieta (LEE, 1987). A nivel comercial, en Japón, se vienen usando las xantofilas (principalmente de langostinos), que son absorbidas y depositadas en la piel, en dietas para la dorada japonesa (KORRINGA, 1976), con el fin de aumentar la coloración rojiza del pez previamente a su comercialización.

Por último, aunque se sabe muy poco sobre posibles efectos secundarios ocasionados por la inclusión de la harina de gluten de maíz en las dietas para peces, BLAZER (1992) muestra un incremento del estrés no específico (BKD) en peces alimentados con gluten de maíz, que se reflejó en la disminución del metabolismo de las proteínas, junto con el incremento de la depleción renal de ascorbato.

En resumen, los máximos niveles de sustitución de la harina de pescado por harina de gluten de maíz y harina de carne y huesos que podrían ser recomendados en función de los resultados del presente experimento, sugieren niveles de hasta un 40% para la harina de gluten de maíz y del 30% para la harina de carne y huesos. Aún considerando el hecho de que la utilización de la harina de carne y huesos fue en cualquier caso algo mejor que la de la harina de gluten, los peores resultados obtenidos a nivel histológico para la harina de carne podrían limitar el nivel de inclusión de la misma en el pienso. De los resultados también se desprende que podría ser muy interesante seguir profundizando en la utilización del gluten de maíz en piensos para esta especie, de acuerdo con la coloración que producen, ya que ésto podría influir de manera positiva en la aceptación del producto final en el mercado.

3.4. EXPERIMENTO 3. MEJORA DE SOJA EN BASE AL EXPERIMENTO 1.

3.4.1. INTRODUCCION.

A la vista de los resultados obtenidos en los dos experimentos anteriores, se podría concluir que todas las materias primas empleadas pueden constituirse en sustitutos potenciales de la harina de pescado en piensos para esta especie. No obstante, las observaciones histológicas en hígado de los peces alimentados con soja evidenciaron una serie de alteraciones (degeneración tisular, acúmulos lipídicos) que se pueden relacionar con disfunciones metabólicas detalladas por algunos autores si la alimentación con dietas que incluyen dicha materia prima se prolonga durante cierto tiempo. Por ello, y dado el indudable interés de emplear la harina de soja en piensos para peces, se planteó el diseño de un nuevo experimento en el que se pretendía ensayar una serie de distintos tratamientos cuyo fin era conseguir la disminución de las alteraciones hepáticas antes mencionadas.

Para ello, y teniendo en cuenta los resultados del Exp. 1, en los que fue descartado tanto un posible efecto de los inhibidores antitripsicos, como un posible desequilibrio de aminoácidos en los piensos formulados con harina de soja, se estudió la posible presencia de otros factores antinutritivos en esta materia prima (Tabla 21).

Tabla 21. Posibles nutrientes limitantes y factores antinutritivos en la harina de soja.

PROBLEMAS	SOLUCIONES
A. Nutrientes limitantes	
1. Metionina y Cistina.	1. Suplementar (Met y Cys) o mezclar con otros ingredientes.
2. P no disponible (unido con fitina).	2. Suplementar con P.
3. Minerales traza (disponibilidad o alteración).	3. Suplementar o defitinizar.
B. Factores antinutritivos	
1. Inhibidores de tripsina.	1. Tratamiento con calor.
2. Inhibidores de quimiotripsina.	2. Tratamiento con calor.
3. Hemaglutininas.	3. Inactivada por los ácidos en el estómago.
4. Acido fítico.	4. Autoclave o suplementación.
5. Factores no identificados que reducen la digestibilidad de proteínas y lípidos.	5. No conocidas.
C. Palatabilidad	Mezclar con atractantes u otros ingredientes.

Entre los factores que no son termolábiles, únicamente el ácido fítico (éster del ácido hexafosfórico e inositol), es el que podría afectar en mayor medida a la utilización de determinados nutrientes presentes en la dieta, entre los que destacan algunos minerales divalentes como el Zn, Mg y Fe, actuando como quelante de los mismos para formar fitatos insolubles en el lumen intestinal, resultando en una disminución de su disponibilidad. El pH

influye de modo decisivo en la formación de estos complejos insolubles (O'DELL y DEBOLAND, 1976). Por otro lado, dos tercios del P contenido en la soja se hallan unidos al ácido fítico, por lo que este ácido representa la mayor proporción de P en la semilla de soja (hasta el 56% del P total), y algo más del 1% del peso total de la misma. La reducción de la disponibilidad de estos minerales en la ración parece afectar a la composición lipídica de los peces, bien sea en el contenido corporal total, o a nivel de hígado o plasma sanguíneo. En este sentido, una de las alternativas que se baraja, principalmente a nivel experimental, es la inclusión de fitasas exógenas que rompan ese ácido fítico contenido en muchos de los ingredientes vegetales, método utilizado en piensos para animales terrestres. Por otra parte, la propia composición en ácidos grasos del aceite aportado a las dietas por la harina de soja, que es muy rico en ácidos grasos de la familia de los n-6, podría también afectar a la deposición de grasas encontrada en los hígados.

A) IMPORTANCIA DEL FOSFORO EN DIETAS PARA PECES. EFECTO DE LA SOJA.

El P es un elemento esencial que todos los peces necesitan para crecer normalmente y para el desarrollo de los huesos, el mantenimiento de la regulación ácido-base y el metabolismo de lípidos y carbohidratos (KETOLA, 1975c; OGINO y TAKEDA, 1976; LOVELL, 1978; COWEY y SARGENT, 1979; LALL, 1979; SAKAMOTO y YONE, 1980; WATANABE et al., 1980abc; TAKEUCHI y NAKAZOE, 1981; COWEY, 1994).

Aunque se ha demostrado muchas veces que los peces toman del agua ^{32}P marcado (TOMIYAMA et al., 1956, en LALL, 1979), se cree que la tasa de absorción es en general muy baja y que los peces recaban el P que necesitan sobre todo de los alimentos que ingieren (PHILLIPS et al., 1957; NOSE y ARAI, 1979).

A pesar de que la disponibilidad o absorción de P de los distintos ingredientes ha sido determinada para pocas especies de peces, se puede decir que los requerimientos de P disponible para los peces varían entre un 0.29 y un 0.90% de la dieta (Tabla 22), dependiendo de las especies (NOSE y ARAI, 1979; OGINO y TAKEDA, 1978; REINITZ et al., 1978a; NRC, 1977, 1983; WILSON et al., 1982; CHO et al., 1985).

Tabla 22. Necesidades de fósforo en la dieta para el crecimiento óptimo de algunas especies de peces.

ESPECIE	NECESIDADES DE P (% P en la dieta)	FUENTE
Salmón carnada (<i>Oncorhynchus keta</i>)	0.50-0.60	Watanabe et al. (1980b)
Trucha (<i>Salmo gairdneri</i>)	0.65-1.09	Ogino y Takeda (1976)
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	0.60-0.70	Ogino y Takeda (1976)
Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	0.40 0.80	Andrews et al. (1973) Lovell (1979)
Dorada japonesa (<i>Chrysophrys major</i>)	0.68 ^a	Sakamoto y Yone (1973, 1979)
Dorada negra (<i>Mylio macrocephalus</i>)	0.11	Yone y Toshima (1979)
Anguila japonesa (<i>Anguilla japonica</i>)	0.29	Arai et al. (1975) ^b

(a) En presencia de menos de 0.34% de Ca.

(b) Citados por Nose y Arai (1979).

La nutrición deficiente por carencia de P tiene como consecuencia una intensificada actividad de gluconeogénesis en el hígado, y con ello el incremento de la síntesis de ácidos grasos a partir de aminoácidos (TAKEUCHI y NAKAZOE, 1981; ONISHI et al., 1981).

MURAKAMI, citado en NOSE y ARAI (1979), encontró que el contenido en lípidos del músculo y vísceras se reducía marcadamente por la adición de fosfato en dietas comerciales para carpa común, incrementándose consecuentemente el contenido en proteínas. Esto sugiere el importante papel del P en el catabolismo metabólico de los lípidos, resultando en una mayor retención de proteínas en el cuerpo del pez.

De manera general, la disponibilidad de P para los peces varía de acuerdo con la fuente de la que proviene (Tabla 23). Así, la disponibilidad del P inorgánico es mayor que la del P

proviniente de fuentes animales, y este a su vez es mayor que el procedente de fuentes de origen vegetal (NEW, 1986). Por lo tanto, los ingredientes dietarios que contribuyen en mayor medida al contenido de P en la dieta son la harina de pescado, la harina de los sub-productos de pollería, harina de carne y huesos y los suplementos minerales con P. La disponibilidad del P inorgánico dependerá de la sal que lo contiene. Así, el P procedente de fosfato tricálcico será menos disponible que el procedente de sales más solubles, como los fosfatos mono y di-cálcico (OGINO et al., 1979; SAKAMOTO y YONE, 1979b).

Tabla 23. Disponibilidad de varios tipos de fosfatos para carpa y trucha arco iris (%).

FOSFATO	CARPA	TRUCHA
Fosfato mono-cálcico	94	94
Fosfato di-cálcico	46	71
Fosfato tri-cálcico	13	64
Fosfato en harina de pescado	10-33	60-81

El P presente en la harina de pescado está en su mayor parte en forma de fosfato óseo (fosfato tricálcico) originado a partir de tejidos duros tales como los huesos y escamas, siendo su disponibilidad muy variable entre unas especies y otras. De esta manera se obtienen, para la carpa, valores de porcentaje de absorción de P de la harina de pescado del orden de 0-33% por carecer esta especie de secreción ácida (TAKAMATSU et al., 1975), en la trucha entre 60 y 81% (en HEPHER, 1988), en la dorada negra o chopo aproximadamente del 30% (YONE y TOSHIMA, 1979), 71% y 65% en chum salmon y tilapia respectivamente (WATANABE et al., 1980abc). Estas diferencias en la disponibilidad del P han sido relacionadas con el diferente nivel de secreción de jugos gástricos para las distintas especies (YONE y TOSHIMA, 1979; OGINO et al., 1979).

RICHE y BROWN (1993), determinaron valores de absorción aparente de P en diferentes ingredientes usados a nivel comercial en la fabricación de dietas para trucha, obteniendo los siguientes resultados: 31.6% (anchoa), 48.3% (arenque), 71.5% (menhaden)

para las harinas correspondientes, siendo negativos para los aminoácidos libres y las fuentes vegetales, a excepción de la harina de cacahuets (16.8%). En el caso de la harina de soja desengrasada el valor fue de -6.6%. Estos valores tan bajos que se obtienen para los ingredientes vegetales se deben a que de un 60 a 80% del P total que contienen se halla en forma de sal cálcica o magnésica de ácido fítico, conocida como fitina, generalmente no disponible para los peces, dado que estos animales no poseen las fitasas necesarias para descomponer esos compuestos (OGINO et al., 1979; LALL, 1979).

B) IMPORTANCIA DEL ZINC EN DIETAS PARA PECES. EFECTO DE LA SOJA.

Es bien conocido que el zinc es un nutriente esencial para el crecimiento y funciones normales del pez (OGINO y YANG, 1978; KETOLA, 1979; HARDY y SHEARER, 1985). Como componente de las metaloenzimas (superóxido dismutasa, carboxipeptidasa), algunas funciones metabólicas en el pez se ven afectadas por la deficiencia de este mineral (CHO et al., 1985 en Finfish Nutr. in Asia).

Sin embargo, este mineral es requerido en muy pequeñas proporciones en la dieta. Así, OGINO y YANG (1978), determinaron unos valores de 15 a 30 mg/kg dieta, mientras que LOVELL (1979), recomienda una tasa mínima de Zn en las dietas de 88 mg/kg.

Por otra parte, UNDERWOOD (1977), encontró que el zinc es generalmente un elemento no tóxico dentro de un amplio rango de concentraciones. Así, KNOX et al. (1982) no pudieron evidenciar diferencias en el crecimiento o conversión del pienso, ni tampoco consecuencias perjudiciales para la salud, con adiciones de Zn de 15 a 600 mg/kg de pienso en truchas arco iris. En el caso del salmón atlántico, *Salmo salar* (MAAGE et al., 1989) probaron dietas en las que las concentraciones de Zn oscilaron entre 200-300 mg/kg, sin que ello provocase ningún tipo de retardo en el crecimiento de los peces.

Uno de los principales signos de deficiencia de Zn en el pienso, además del retardo en el crecimiento y disminución en la conversión alimenticia, es la aparición de cataratas en los ojos (KETOLA, 1978).

El contenido de Zn en la harina de pescado es relativamente alto (100-150 mg/Kg), de tal forma que las fórmulas que contengan harina de pescado sin suplemento de Zn contendrán

aproximadamente 35-45 miligramos de Zn por kg de dieta, más de lo que es generalmente requerido por los peces estudiados hasta ahora (WATANABE, 1988 en Fish Nutrition and Mariculture).

Otro factor a tener en cuenta es el que la biodisponibilidad del Zn puede verse adversamente afectada por la composición del alimento. Factores tales como el incremento de Ca dietario, el incremento en fitatos, la fuente de proteína y el procesado de la dieta pueden aumentar o disminuir la disponibilidad del Zn para el animal (HILTON, 1989). En este sentido, como se comentó para el P, normalmente todos los ingredientes de origen vegetal contienen fitatos, que dan lugar a la formación de precipitados insolubles en los que se ven envueltos generalmente el P y Zn interfiriendo negativamente en la absorción de los mismos (SHEARER, 1984).

En el caso de la soja, la disponibilidad relativa del Zn que contiene es altamente variable. La formación o hidrólisis de los complejos proteína-ácido fítico-minerales durante el procesado del alimento en el que están envueltos los productos de la soja, puede explicar esta variabilidad en la disponibilidad de los minerales de los diferentes productos de la soja (ERDMAN y FORBES, 1981).

De los resultados obtenidos al alimentar pez gato de 6 g de peso con fórmulas purificadas (proteína de huevo) conteniendo diferentes niveles de Ca, fitatos y Zn, se observa que el aumento del fitato dietario reduce la disponibilidad del Zn, efecto que puede ser exacerbado en presencia de altos niveles de Ca en el pienso (GATLIN y PHILLIPS, 1989). Según estos autores, niveles de Zn en la ración de 200mg Zn/kg proveen suficiente Zn disponible, incluso cuando la dieta contiene grandes concentraciones de fitatos .

C) UTILIZACION DE FITASAS EXOGENAS EN DIETAS PARA PECES.

La adición de enzimas suplementarios en piensos para peces ha recibido poca atención, y muchos de los estudios se han concentrado en dietas para larvas (DABROWSKA et al., 1979; UYS et al., 1987; MUNILLA-MORAN et al., 1990).

En adición a las carbohidrasas, los resultados obtenidos con el empleo de fitasas en animales terrestres (CROMWELL, 1991; CAMPBELL y BEDFORD, 1992), las presentan

como una solución alternativa y económicamente satisfactoria al problema del fósforo inorgánico en regiones donde tanto la densidad de población, como la producción intensiva de animales es muy alta; representando el excesivo fósforo proveniente de los desperdicios animales una grave preocupación a nivel internacional (JONGBLOED y KEMME, 1990; SIMONS et al., 1990). En este contexto, las fitasas aparecen altamente efectivas, ya que aunque parece que no son capaces de defosforilar completamente los fitatos, son lo suficientemente efectivas como para alterar la solubilidad característica de los mismos y hacerlos susceptibles a la digestión de las fosfatasas que ocurre en el intestino (CAMPBELL y BEDFORD, 1992).

Por lo tanto, las fitasas dietarias juegan un papel importante en la rotura de los fitatos, que representan la forma más usual en la que se encuentra el fósforo en las plantas. El fósforo fitico es muy poco disponible, pudiendo además afectar a la disponibilidad de otros nutrientes durante la digestión, entre los que se incluyen el calcio (NELSON y KIRBY, 1987), el zinc (KEITH y BELL, 1987), y las proteínas (LATHIA et al., 1987; CARNOVALE et al., 1988).

En resumen, la suplementación con fitasas en aquellas dietas para peces que contienen proteínas de origen vegetal, podría ser una buena alternativa con la que mejorar la utilización de la dieta en general; siendo además una buena forma de reducir la polución de P generada en los efluentes de las granjas de producción intensiva de peces, la cual como se ha visto es uno de los graves inconvenientes con los que se enfrenta este tipo de producción. En este sentido hay que considerar que los nuevos avances en biotecnología permiten la producción eficiente de fitasas, aunque el precio de estas enzimas es todavía relativamente alto.

D) IMPORTANCIA DE LA RELACION DE ACIDOS GRASOS n-3/n-6 EN LAS DIETAS PARA PECES.

La esencialidad de los n-3 HUFA para los peces marinos ha sido demostrada en numerosas especies (SARGENT et al., 1989). Sin embargo, aún está por determinar la importancia de los ácidos grasos de la serie n-6 en las dietas para estos peces. Concretamente, el ácido linolénico (18:2n-6), componente mayoritario en los lípidos de la harina de soja, no es eficazmente utilizado por los juveniles de rodaballo (COWEY et al., 1976), llegando incluso a inhibir el crecimiento en algunas especies (STICKNEY y

ANDREWS, 1972) si el nivel dietario excedía del 1% (YU y SINHUBER, 1979). También parece ejercer un efecto negativo en la reproducción de algunos espáridos como la dorada japonesa (*Pagrus major*) (WATANABE et al., 1984).

Parece claro, que la relación n-3/n-6 en los lípidos de los peces se ve afectada en gran medida por la relación n-3/n-6 de los lípidos dietarios. Cuando la dieta es muy rica en ácidos grasos n-6, típico en aceites de origen vegetal o aceites procedentes de animales homeotermos, el pez tiene tendencia a alterar la relación de PUFAS incorporados en favor de los ácidos grasos n-3. Cuando el aceite dietario es aceite de pescado, rico en ácidos grasos n-3, se observa sólo un pequeño cambio en la relación n-3/n-6 de los lípidos incorporados en el pez (CASTELL, 1979).

En peces se ha demostrado la competencia entre los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 como sustratos de varias enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos, de ahí la importancia del equilibrio en la relación n-3/n-6 PUFA (ácidos grasos polinsaturados con más de 18 carbonos) en las dietas de engorde para peces marinos señalada por varios autores (SARGENT et al., 1989). De hecho, los fosfolípidos de los peces están caracterizados por una relación n-3/n-6 de 10/1 (ACKMAN, 1980).

Muchos aceites de pescado tienen un contenido muy bajo en n-6 PUFA y muy altos en n-3-PUFA (CASTELL, 1979). Por el contrario, los aceites de maíz y de soja son ricos en 18:2n-6, sirviendo como fuente de ácidos grasos de la serie n-6 (WATANABE, 1989 en Progress in Fish Nutr.). Incrementos de harina de soja en las dietas producen un aumento del 18:2n-6 en los peces (WATANABE et al., 1992). YONE y FUJII (1975b) encontraron una reducción en los 18:1 incorporados en los fosfolípidos del hígado en dorada roja cuando 18:2n-6 ó 18:3n-3 fueron añadidos a la dieta. La dorada europea es una especie marina que no parece tener capacidad para elongar y desaturar ácidos grasos (OWEN et al., 1975; YAMADA et al., 1980), además según KALAGEROPOULOS et al. (1991), la composición en ácidos grasos tanto en hígado como en músculo de esta especie, parece responder a los diferentes tratamientos dietarios.

Uno de los principales síntomas de ácidos grasos esenciales es el engrosamiento y el acúmulo de grasas en el tejido hepático (TAKEUCHI et al., 1979). El principal sitio de la

lipogénesis en los peces es el tejido hepático. La lipogénesis posiblemente es regulada tanto por el nivel dietario de lípidos como por la composición de los mismos. En este sentido, los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta serían más efectivos en la inhibición de la lipogénesis (JEFFCOAT et al., 1979). Un desequilibrio en la composición de ácidos grasos de la dieta afectaría de forma negativa la acumulación de grasas en el hígado.

3.4.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Partiendo de las consideraciones reseñadas en la introducción anterior, se formularon una serie de dietas en las que se intentó suplementar a la soja con aquéllos nutrientes o compuestos cuya adición podría ayudar a una mejor utilización de los piensos que incluyen soja en elevadas proporciones, con el objeto de evitar o minimizar las alteraciones histológicas hepáticas observadas en el Exp. 1.

Para llevar a cabo la presente experiencia se diseñaron 6 dietas con las siguientes características:

- | | |
|-------------------------|---|
| Dieta 1 (C) .- | Control positivo, con harina de pescado como única fuente de proteínas. |
| Dieta 2 (S30).- | Control negativo, en la que un 30% de la proteína de pescado se sustituyó por proteína de soja. |
| Dieta 3 (S30+P).- | S30 suplementada con P en la forma de KH_2PO_4 hasta alcanzar el porcentaje teórico de P disponible en la dieta C. |
| Dieta 4 (S30+Zn).- | S30 suplementada con Zn en la forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hasta un nivel de 200 mg/kg (GATLIN y PHILLIPS, 1989). |
| Dieta 5 (S30+fitasas).- | S30, a la que se añadieron fitasas exógenas en la cantidad suficiente para liberar el P contenido en el ácido fítico. |
| Dieta 6 (S30+n-3/n-6).- | S30, en la que se corrigió la relación de ácidos grasos n-3/n-6 en función de la que se obtiene en la dieta control positivo. |

Los dos ingredientes proteicos utilizados en este experimento fueron obtenidos a nivel local. En primer lugar, se tomó una muestra de la soja para el análisis de su actividad antitripsica, que resultó ser inferior a 3 TIA (mg de tripsina inhibida/g de harina de soja), valor que se considera adecuado para su inclusión en dietas para peces. A continuación se determinó la composición de ambos ingredientes. En este caso fue preciso además, el análisis de los ácidos grasos contenidos en las dos harinas, así como en el aceite de pescado utilizado como fuente de lípidos en las dietas (Tabla 24).

Tabla 24. Composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos del experimento de mejora de soja (g/100g peso).

INGREDIENTES	HARINA DE PESCADO	HARINA DE SOJA	ACEITE DE PESCADO
Proteínas	69.58	43.77	-
Lípidos	8.35	1.18	100
Ceniza	15.98	6.89	-
Ca*	2.20	0.26	-
P*	1.68	0.61	-
Zn*	0.0132	0.006	-
Σ n-3-HUFAS ^a	3.24	0.19	36.44
Σ n-6 ^a	0.34	1.15	4.15
n-3/n-6 ^a	9.53	0.17	8.78
Humedad	7.64	11.37	-

* Datos extraídos del N.R.C. (1983). Para la soja se tomó el ingrediente clasificado como 5-04-600, y para la harina de pescado el 5-02-000.

^a Valores en g/100 g de peso seco del ingrediente.

La cantidad total de Ca, P y Zn calculados, así como sus relaciones entre las dietas control positivo y control negativo, teniendo en cuenta la cantidad de los mismos aportada por las mezclas de minerales, quedaría resumida en la siguiente tabla (Tabla 25).

Tabla 25. Composición en Ca, P y Zn de las dietas C y S30 utilizadas en el experimento de mejora de soja.

INGREDIENTES	DIETA C	DIETA S30
Ca (%)	1.546	1.206
P (%)	1.16	1.01
Zn (mg/kg)	1.40	128.5
Ca/P	1.33: 1.00	1.19:1.00
Zn/Ca	1:110	1:94

En esta tabla se puede observar que el tratamiento S30 presenta un déficit de minerales con respecto al control. Este hecho se ve agravado por la presencia de ácido fítico en la harina de soja. En este sentido, hay que tener en cuenta que aunque las relaciones Zn:Ca sean similares en ambas dietas, la presencia de ácido fítico disminuiría la disponibilidad del Zn en el pienso S30, la cual se ve agravada en presencia de Ca.

Haciendo cálculos con los valores obtenidos en la tabla anterior, y considerando que sólo un 70% del P presente en la harina de pescado es disponible para los peces, se obtiene para la dieta S30 un porcentaje de P disponible del 0.66%, superior al 0.6% recomendado por Watanabe (comunicación personal). Por lo tanto se ajustó la dieta S30+P al 0.9% de P disponible teórico que tiene el control positivo, añadiendo una sal monovalente (KH_2PO_4) de la que suponemos que todo el P puede ser absorbido por el pez.

Para la formulación del pienso S30 + fitasas se partió de la información bibliográfica recopilada, según la cual en cada kg de harina de soja hay entre 15-16 g de fitatos. De esta cantidad únicamente entre un 35-38% (fracciones soluble e insoluble) es hidrolizable por las fitasas, lo que supone unos 5.66 g de fitato por cada kg de harina de soja. Utilizando fitasa cruda de *Aspergillus ficuum* (SIGMA P-9792), la cual es capaz de liberar por cada unidad de enzima 0.001 moles de P de cada 42 milimoles de fitato, y teniendo en cuenta que el PM

del fitato es de 720.4 g y que 1 mol de fitato contiene 6 moles de P inorgánico, se puede calcular que se necesitan 798.86 unidades de fitasa por kg de la dieta S30 (296 g SBM/kg de dieta).

Por último, para la formulación de la dieta S30+n-3/n-6, se hizo preciso desengrasar previamente toda la harina de soja a utilizar, puesto que a pesar de que la cantidad de aceite aportada por esta harina era muy poca, su elevada proporción de ácidos grasos de la serie n-6 haría que se desequilibrase rápidamente la relación n-3/n-6 de la dieta resultante. Para ello se utilizó cloroformo, en el cual es completamente insoluble el ácido fitico (MERCK, catálogo). La composición lipídica de los ingredientes analizados por cromatografía se muestra en la tabla siguiente (Tabla 26).

Tabla 26. Composición lipídica de los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas ensayadas en el experimento de mejora de soja.

INGREDIENTES	ACEITE DE SARDINA	HARINA DE SARDINA	HARINA DE SOJA	HARINA DE SOJA DESENGR.
n-3 HUFA TL	29.83	2.71	0.01	0.00
n-3	36.44	3.24	0.19	0.00
n-6	4.15	0.34	1.15	0.00
% LIPIDOS	100.00	9.04	2.57	0.00

Lo que se hizo fue ajustar la formulación de la dieta S30+n-3/n-6 en base a la relación n-3/n-6 que se obtiene para el control positivo. Atendiendo a esto, la composición lipídica de los diferentes piensos quedaría según la Tabla 27.

Tabla 27. Composición lipídica de las dietas experimentales utilizadas en el experimento de mejora de soja.

DIETA	CONTROL	S30	S30 EQUILIBRADA
Aceite de sardina	6.60	7.30	8.00
Harina de sardina	57.08	39.25	39.25
Harina de soja	0.00	26.23	0.00
Harina de soja desengrasada	0.00	0.00	26.23
% LIPIDOS	11.76	11.52	11.55
$\Sigma n-3$	4.25	3.98	4.19
$\Sigma n-6$	0.47	0.74	0.40
n-3/n-6	9.09	5.39	9.00

La formulación definitiva de todas las dietas a ensayar en el presente experimento así como la composición de las mismas aparecen en la Tabla 28.

Para la realización de este ensayo se utilizaron doradas de unos 50 g de peso medio inicial, repartidas al azar en grupos de 15 peces en los tanques experimentales, tras un período previo de aclimatación. Los tanques fueron provistos de flujo continuo (1 l/min) de agua de mar ($18.4 \pm 0.45^\circ\text{C}$), siendo las concentraciones medias de O_2 y pH medidos a lo largo del período experimental de 7.25 ± 0.65 y 7.8 ± 0.2 respectivamente. Los peces fueron alimentados hasta la saciación, cuatro veces al día, seis días por semana, a lo largo de los 75 días de duración del ensayo. En el caso de los peces alimentados con los tratamientos Control y S30 se consideró apropiado continuar el experimento hasta los 90 días, con el fin de comprobar que realmente no se producen diferencias en el crecimiento de los peces como consecuencia de la alimentación con estas dos dietas.

Tabla 28. Formulación y composición de las dietas ensayadas en el experimento de mejora de la harina de soja.

INGREDIENTES (% peso húmedo)	C	S30	S30 + P	S30 + Zn	S30 + Fitasa	S30 + n-3/n-6
Harina de pescado	61.80	42.50	42.50	42.50	42.50	42.50
Harina de soja	-	29.60	29.60	29.60	29.60	29.60 ⁴
Aceite de pescado	6.60	7.30	7.30	7.30	7.30	8.00
Almidón de maíz	12.07	12.07	8.01	12.07	12.07	12.07
Dextrina	4.03	4.03	2.68	4.03	4.03	4.03
Vitaminas ¹	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Minerales ²	2.00	2.00	1.32 ⁵	2.00	2.00	1.32 ⁵
CMC ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α -Celulosa	11.00	-	-	-	-	-
P[KH ₂ PO ₄] ⁴	-	-	6.10 ⁶	-	-	-
Zn [ZnSO ₄ • 7H ₂ O]	-	-	-	0.03 ⁶	-	-
Fitاسا	-	-	-	-	0.02 ⁶	-
COMPOSICION (% peso seco)						
Humedad	7.78	6.65	7.49	6.77	7.99	6.59
Proteínas	44.78	47.99	48.47	48.22	48.38	47.11
Lípidos	11.17	11.00	11.00	10.98	10.81	11.01
Ceniza	10.93	10.44	15.70	10.70	10.26	10.35
Fibra	13.00	4.96	4.38	4.89	5.05	4.77
Carbohidratos ⁷	20.12	25.61	20.45	25.21	25.50	26.76
Energía bruta (Kj/g)	19.01	19.39	18.40	18.82	19.42	19.31

(1) y (2) Composición de las mezclas en la Tabla 7.

(3) Carboximetil celulosa.

(4) Harina de soja desengrasada.

(5) Mezcla de minerales sin α -celulosa.(6) Cantidad añadida a expensas de la α -celulosa de la mezcla de minerales.

(7) Calculados por diferencia (100-resto ingredientes).

3.4.3. RESULTADOS.

CRECIMIENTO Y UTILIZACION DEL ALIMENTO.

Los valores obtenidos para el crecimiento y utilización del alimento de los peces alimentados con los diferentes piensos experimentales aparecen en la Tabla 29. En los resultados se observa la no existencia de diferencias significativas entre los pesos corporales finales de los peces alimentados con las diferentes dietas, así como en el crecimiento en porcentaje con respecto a los pesos medios iniciales (Fig. 17), siendo ambos ligeramente inferiores en el caso de la dieta S30+P. Además, se pudo comprobar que tras un período de 90' días de experimentación que el crecimiento de los peces alimentados con las dietas Control y S30, 90.70% y 91.58% respectivamente, no mostraron tampoco diferencias significativas.

En cuanto a las ingestas totales y proteicas de los peces, únicamente se observaron diferencias en los peces alimentados con el control, que resultó ser superior al resto de los tratamientos. Cabría destacar en este sentido que la dieta S30+P fue la peor aceptada por los peces al principio del experimento.

La utilización de las diferentes dietas en base a los valores de FE y PER mostró ser muy homogénea para todos los piensos experimentales, siendo los resultados obtenidos para ambos índices bastante bajos.

La diferencia más notable encontrada estuvo en los valores de los índices hepatosomáticos. Así se tuvo que la inclusión de P en la dieta base con un 30% de soja disminuía significativamente el tamaño de los hígados de los peces.

Tabla 29. Crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y de la proteína e índice hepatosomático para los piensos experimentales del ensayo de mejora de soja.

	C	S30	S30+P	S30+Zn	S30+Fitasas	S30+n-3/n-6
Peso medio inicial (g)	52.31 ^a ±9.72	51.78 ^a ±8.33	51.09 ^a ±9.54	50.56 ^a ±9.85	52.60 ^a ±9.81	51.93 ^a ±8.49
Peso medio final (g)	87.68 ^a ±14.00	85.95 ^a ±13.99	79.65 ^a ±15.65	82.35 ^a ±13.66	86.96 ^a ±15.36	86.14 ^a ±12.93
Incremento peso (% peso inicial)	67.73 ^a ±7.33	65.84 ^a ±5.59	55.94 ^a ±2.73	62.69 ^a ±6.74	65.77 ^a ±5.02	66.01 ^a ±5.71
Ingesta total (g)	1411.10 ^b ±40.20	1095.57 ^a ±73.22	1042.57 ^a ±59.14	1119.63 ^a ±68.59	1153.67 ^a ±86.34	1125.20 ^a ±44.69
Ingesta proteica (g)	583.27 ^b ±18.73	490.83 ^a ±32.81	467.50 ^a ±26.52	502.50 ^a ±30.67	513.50 ^{ab} ±38.45	495.20 ^a ±19.66
FE	0.41 ^a ±0.05	0.50 ^a ±0.05	0.45 ^a ±0.04	0.46 ^a ±0.06	0.49 ^a ±0.03	0.49 ^a ±0.05
PER	0.92 ^a ±0.11	1.04 ^a ±0.10	0.92 ^a ±0.08	0.94 ^a ±0.12	1.01 ^a ±0.07	1.04 ^a ±0.11
HSI	1.82 ^b ±0.08	1.59 ^b ±0.05	1.30 ^a ±0.17	1.67 ^b ±0.03	1.58 ^b ±0.12	1.57 ^{ab} ±0.07

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

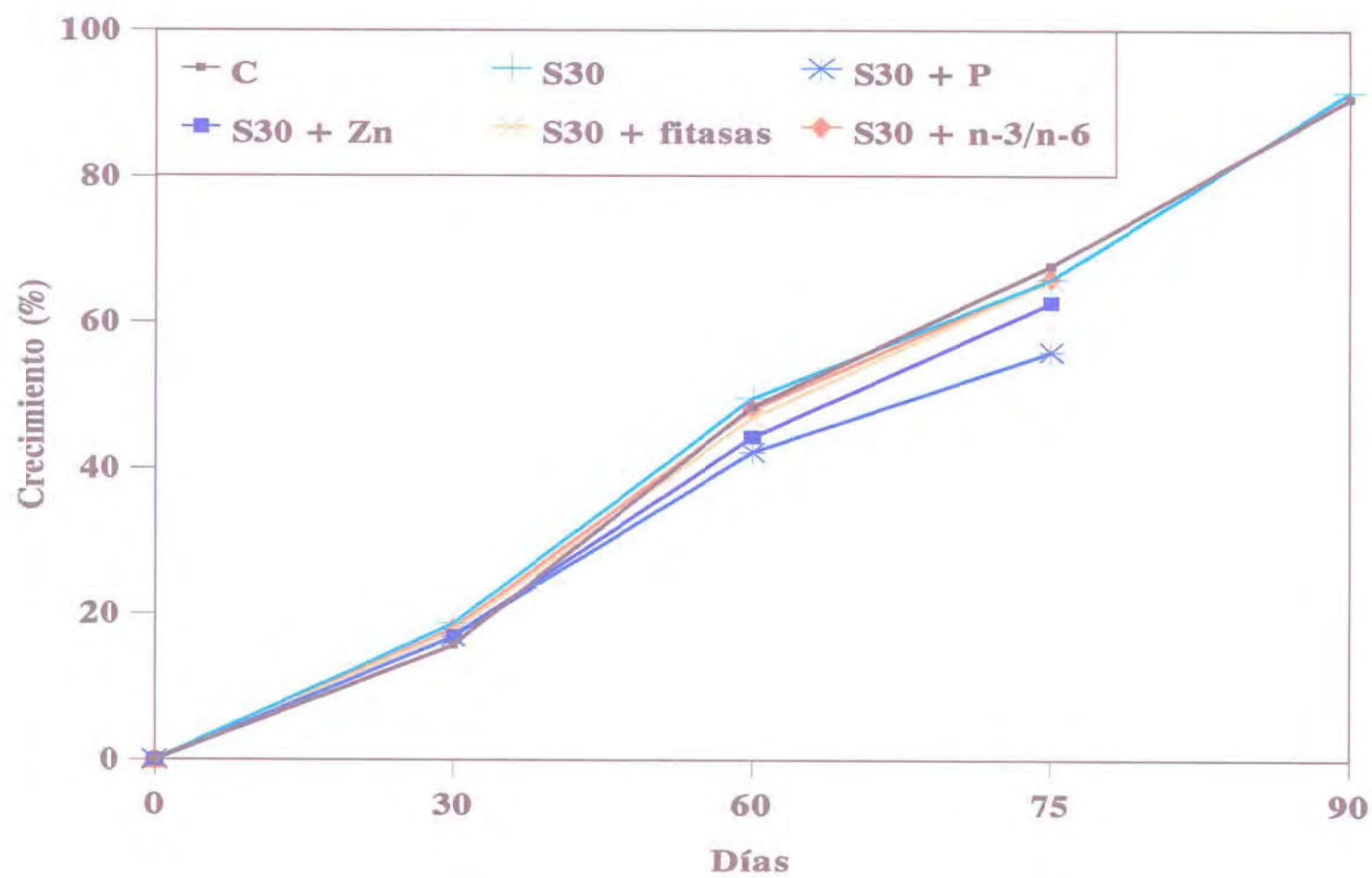


Fig. 17. Incremento de peso (% sobre el peso inicial).

COMPOSICION CORPORAL DE LOS PECES.

La composición corporal de los peces alimentados con los diferentes piensos experimentales se muestra en la Tabla 30. Comparando los resultados obtenidos entre el control con harina de pescado y la dieta S30 se tiene que para ambos casos la composición de los peces fue muy homogénea con la excepción de los lípidos que fueron significativamente mayores para los peces control. Por otro lado, realizando la comparación entre los peces alimentados con los tratamientos que incluyeron harina de soja se observa que únicamente los peces que ingirieron la dieta S30+Fitassas mostraron una composición muy similar a los de la dieta S30. Por el contrario, los tratamientos S30+Zn y S30+n-3/n-6 soportaron con respecto al S30 un mayor contenido en lípidos corporal y menor en proteínas, mientras que la dieta S30+P dió lugar a peces cuya composición fue significativamente inferior en lípidos y superior en proteínas. La composición corporal lipídica osciló entre aproximadamente un 15% para los peces alimentados con la dieta S30+P y un 22% para los de la dieta S30+n-3/n-6. El contenido en humedad mostró una tendencia contraria a los lípidos, aunque sin diferencias significativas entre los diferentes piensos que incluyeron soja. En cuanto a la composición en cenizas, se tuvo que ésta resultó significativamente menor que para la S30 en los peces alimentados con las dietas S30+Zn y S30+n-3/n-6.

Por otro lado, la composición de los hígados alimentados con los diferentes tratamiento se muestra en la la Tabla 31. En ella se observa que únicamente el tratamiento con la dieta S30+P produjo alteraciones en la composición con respecto a los peces alimentados con la S30. Así se tuvo un aumento significativo en la humedad de las muestras para la dieta S30+P a expensas del contenido en lípidos, aunque sin diferencias significativas en este último caso.

ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

De manera general, al igual que en los experimentos anteriores, los hígados de los peces alimentados con la dieta control mostraron unas características histológicas que habíamos considerado como normales, si bien en el presente ensayo se encontró en los mismos algunos depósitos muy ligeros de grasa.

Tabla 30. Composición de los músculos de los peces utilizados en el experimento de mejora de la harina de soja (g/100 g de peso seco).

	C	S30	S30+P	S30+Zn	S30+Fitasas	S30+n-3/n-6
Proteínas	73.88 ^{ab} ±1.41	75.31 ^b ±1.99	79.26 ^c ±2.81	74.06 ^{ab} ±1.36	75.24 ^b ±0.80	72.06 ^a ±0.77
Lípidos	19.86 ^c ±0.91	17.57 ^b ±1.82	15.40 ^a ±0.84	20.09 ^c ±1.37	18.87 ^{bc} ±0.85	22.89 ^d ±0.84
Ceniza	5.22 ^{bc} ±0.12	5.51 ^{cd} ±0.13	5.55 ^d ±0.05	5.14 ^b ±0.10	5.28 ^{bcd} ±0.35	4.78 ^a ±0.12
Humedad	71.83 ^{ab} ±1.42	72.28 ^{abc} ±1.37	73.56 ^c ±0.73	71.30 ^{ab} ±0.76	72.48 ^{bc} ±1.03	70.88 ^a ±1.21

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Tabla 31. Composición de los hígados de los peces utilizados en el experimento de mejora de la harina de soja (g/100 g peso seco).

	C	S30	S30+P	S30+Zn	S30+Fitasas	S30+n-3/n-6
Lípidos	18.12 ^a ±1.57	17.10 ^a ±2.92	15.97 ^a ±2.51	16.10 ^a ±0.69	16.81 ^a ±1.90	17.00 ^a ±1.90
Humedad	69.48 ^a ±1.24	70.87 ^a ±1.37	73.52 ^b ±1.09	71.17 ^a ±0.36	71.01 ^a ±0.84	71.08 ^a ±0.75

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Por otro lado, comparando los diferentes tratamientos con respecto al control negativo se observó que únicamente el S30+n-3/n-6 (Fig. 23), y en menor medida el S30+P parecieron mejorar las peores condiciones que, como se vió en el Exp. 1, caracterizaban a los hígados de los peces alimentados con la dieta S30. En el presente experimento también se obtuvieron en los peces tratados con el pienso S30 cortes histológicos hepáticos con abundantes zonas en las que se observó migración de núcleos en los hepatocitos, así como focos necróticos puntuales (Fig. 18). Cabría destacar además para esta dieta la aparición de áreas periféricas al tejido pancreático con vertidos de sustancias fuertemente eosinófilas, aparentemente provenientes del mismo páncreas (Fig. 19).

En el caso de la dieta S30+P (Fig. 20), los hígados presentaron además de ligeros depósitos lipídicos, citoplasmas más condensados con células más pequeñas que para el resto de los tratamientos. Para el pienso S30+Zn en general no se observó tampoco mucha grasa aunque en algunos peces se apreciaron zonas con grandes acúmulos de lípidos (Fig. 21). Por el contrario, el tratamiento S30+fitasas produjo unas características histológicas hepáticas muy similares a las encontradas para la dieta S30 del Exp. 1, con bastantes depósitos grasos, citoplasmas vacuolarizados y algunos focos necróticos, destacando además la presencia de relativamente abundantes áreas de degeneración grasa (Fig. 22).

En cuanto a las tinciones PAS positivas, éstas fueron bastante más intensas para la dieta S30+P que para el resto de los tratamientos, incluido el control.

Por último, con la finalidad de profundizar un poco más en las implicaciones histológicas producidas por las diferentes fórmulas, en el presente experimento se realizó una comparación entre las microvellosidades intestinales en aquellos peces alimentados con las dietas Control y S30. En este sentido encontramos que aunque no existieron diferencias significativas en relación al tamaño de las mismas, sí que aparecieron más "desorganizadas" para el tratamiento S30 que para el control Figs. 24 y 25 respectivamente.

Control	1.399 ^a μ m
Dieta S30	1.529 ^a μ m

De todos los tratamientos con que se intentó mejorar la utilización de la soja, únicamente el S30+n-3/n-6 pareció mejorar esta "desorganización" encontrada en las microvellosidades intestinales de los peces.

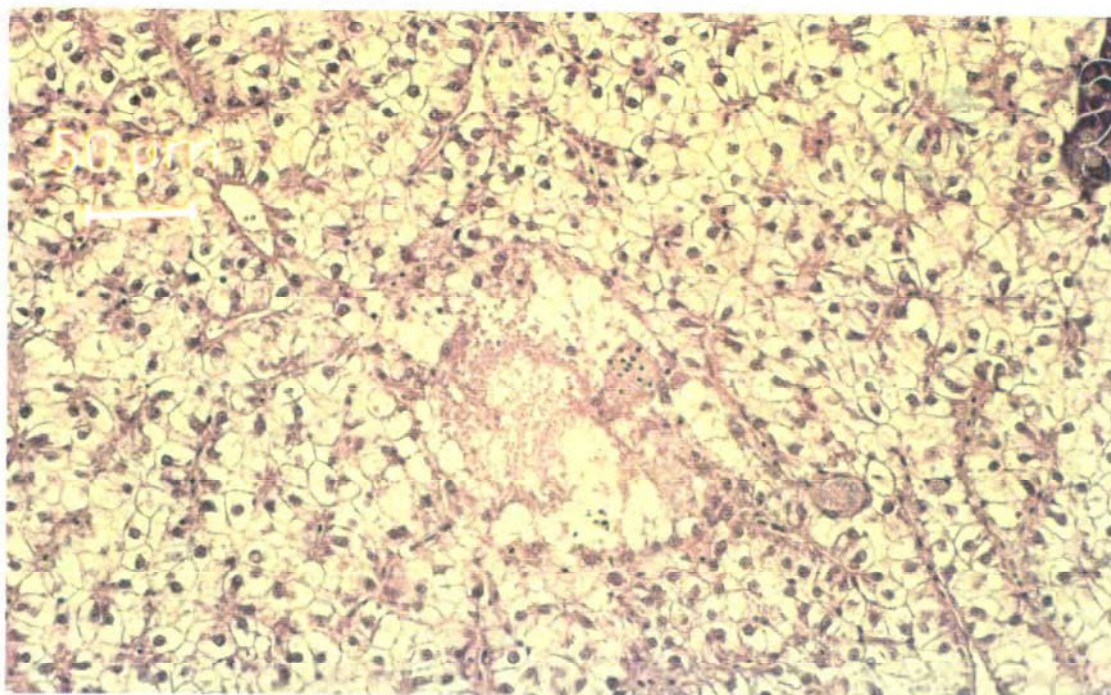


Fig. 18. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30.

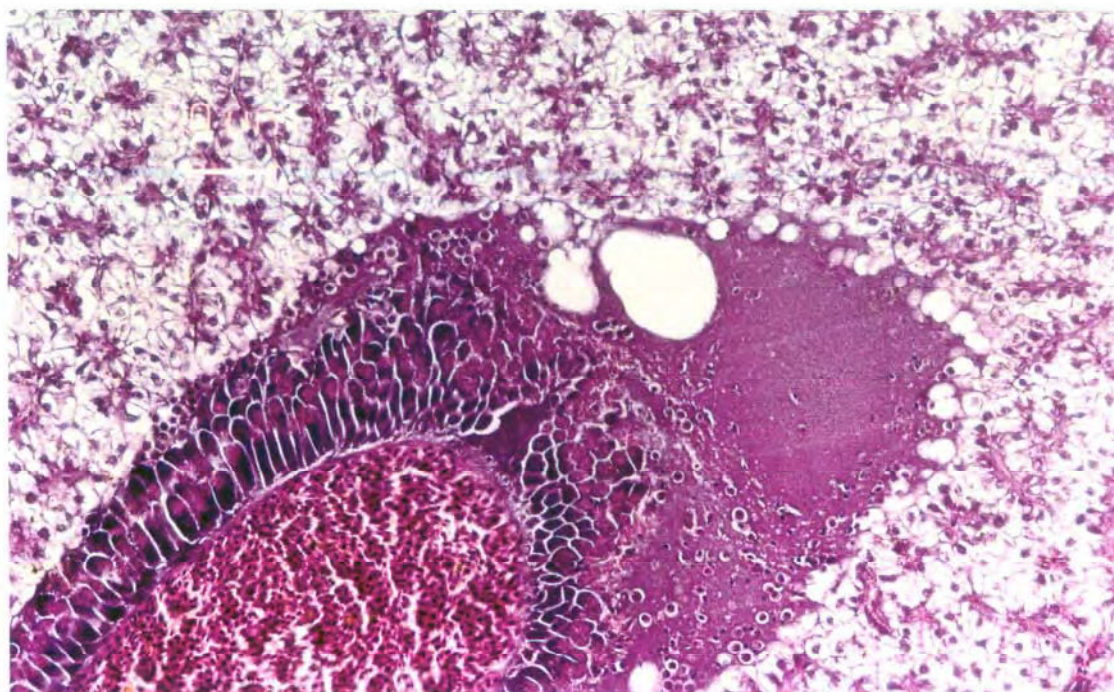


Fig. 19. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30.

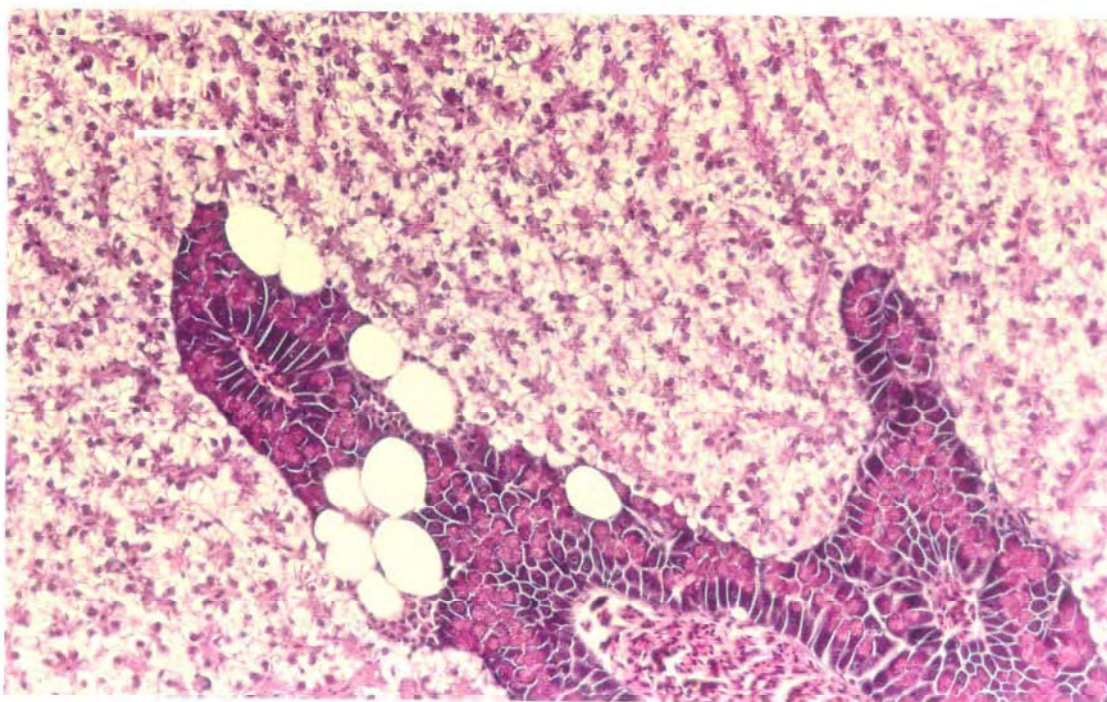


Fig. 20. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+P.

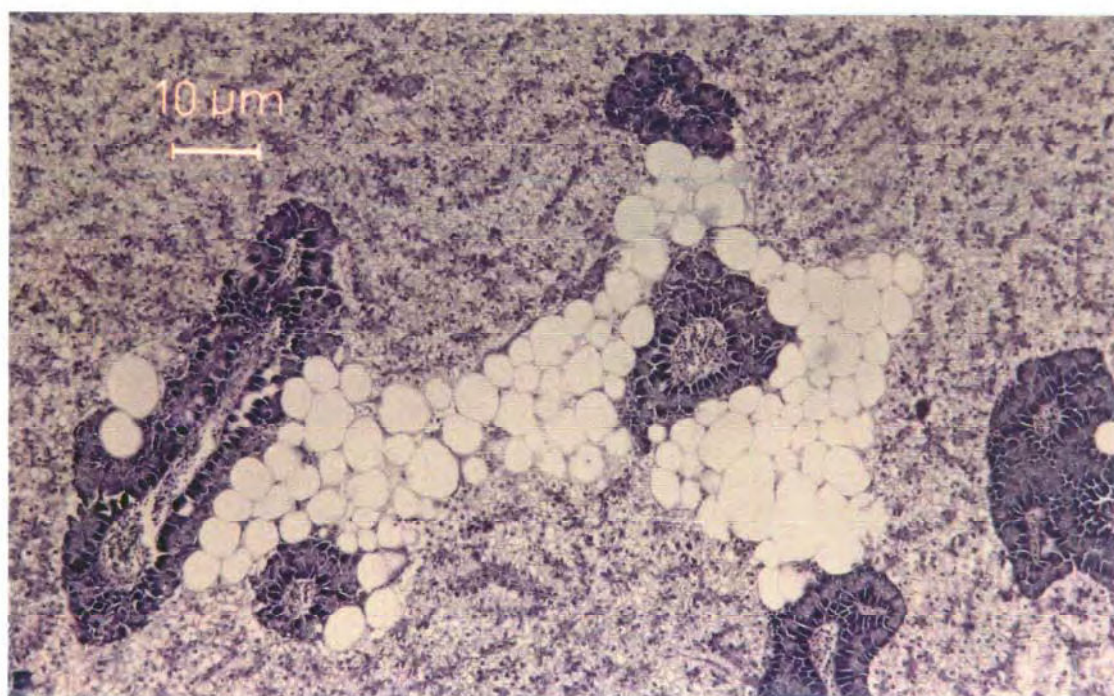


Fig. 21. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+Zn.

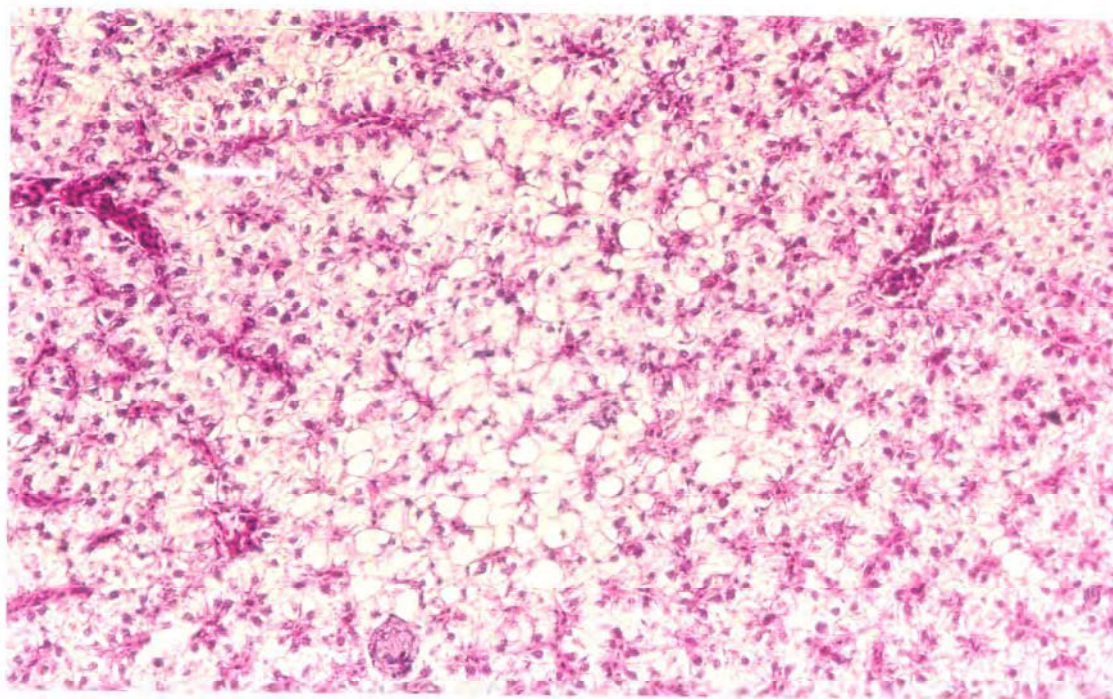


Fig. 22. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+Fitasas.



Fig. 23. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+n-3/n-6.

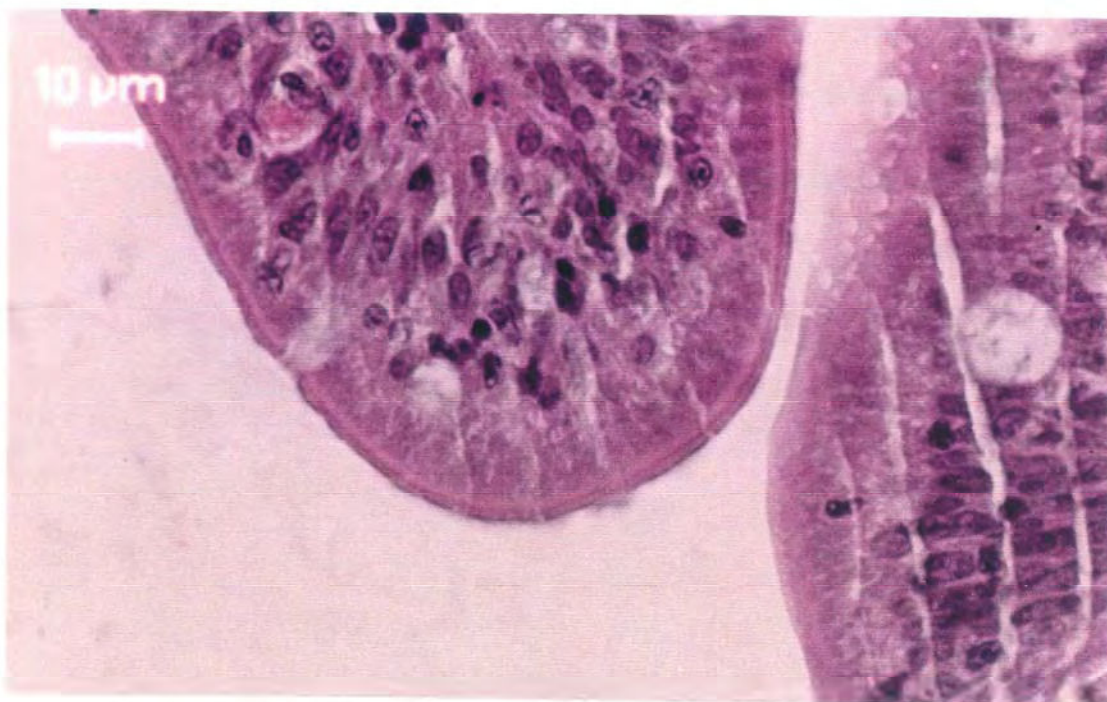


Fig. 24. Microvellosidades intestinales en peces alimentados con la dieta C.



Fig. 25. Microvellosidades intestinales en peces alimentados con la dieta S30.

3.4.4. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento y utilización nutritiva de las distintas dietas con un 30% de harina de soja son estadísticamente similares a los del Control con sólo harina de pescado, como ocurrió en el Exp. 1. Estos resultados contrastan con aquellos obtenidos por RICHARDSON et al. (1985) para salmón chinook, SPINELLI et al. (1983) para trucha y HOSSAIN y JAUNCEY (1991) para carpa, quienes observaron que incrementos de ácido fítico en la dieta fueron acompañados por depresiones tanto en el crecimiento como en la utilización del alimento por los peces. En cualquier caso, los resultados de FE y PER fueron menores que los obtenidos en el Exp. 1 para todas las dietas, posiblemente por las menores temperaturas del agua observadas en el presente experimento ($18.40 \pm 0.45^\circ\text{C}$).

En el caso del tratamiento S30+P cabría destacar el hecho de que los índices hepatosomáticos de los peces alimentados con esta dieta resultaron significativamente menores a los del resto de los piensos, lo que estaría en concordancia con algunos trabajos en los que deficiencias de P en el alimento pueden provocar una alteración en el metabolismo de lípidos y proteínas, favoreciendo la acumulación de grasa a nivel de los hígados, con el consiguiente incremento de los HSI. SAKAMOTO y YONE (1978), y SAKAMOTO (1981) mostraron este tipo de resultados para la dorada japonesa alimentada con dietas deficientes en P, observando además que este aumento en el tamaño de los hígados respondía a incrementos en el contenido en lípidos de los mismos. Todo esto concuerda en cierta medida con los resultados observados en el presente experimento, en el que un aumento en el contenido en P en la dieta provocó una gran depresión en el tamaño de los hígados de los peces. Sin embargo, aunque esta disminución en los índices hepatosomáticos (Tabla 31), vino acompañada por una disminución en el contenido en lípidos, ésta no llegó a ser significativa. Otros autores que han encontrado resultados de este tipo son SAKAMOTO y YONE (1973), trabajando con la dorada roja, y MURAKAMI (1967) quien encontró en carpa común que la adición de un 4% de hidrógeno fosfato de sodio en la ración prevenía la aparición de signos de deficiencia de P, obteniendo también mejores resultados de crecimiento y utilización del alimento.

Las composiciones corporales finales de los peces se vieron bastante influenciadas por los diferentes tratamientos. Se puede observar una disminución en el contenido en lípidos de

los peces alimentados con la dieta S30 con respecto a los alimentados con la dieta control, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por RICHARDSON et al. (1985), para salmón y HOSSAIN y JAUNCEY (1991) para carpa. PFEFFER y BECKMANN (1991) también observaron que al incrementar la proporción de soja en piensos para trucha, se producía una disminución en el contenido corporal en lípidos. Esto pudiera ser indicativo de una disminución en el contenido en energía digestible de las dietas al aumentar la soja, probablemente debido a los carbohidratos presentes en la misma. LEE y PUTNAM (1973) y KAUSHIK et al. (1989), también encontraron una reducción en los lípidos corporales con la disminución de la energía digestible en dietas para trucha.

Por otro lado, la adición de las fitasas exógenas no mejoró aparentemente la utilización de la dieta S30. En este sentido, existen algunas controversias con los resultados de otros trabajos en los que sí se obtuvieron mejoras evidentes relativas a la inclusión de fitasas en la dieta (SPINELLI et al., 1979; BROWN, 1991; SCHÄEPER et al., 1994). Sin embargo en otras investigaciones con enzimas exógenas, mezcla de proteasas (REINITZ, 1983), o de proteasas y carbohidrasas (CARDENETE et al., 1993), tampoco fueron observadas diferencias entre las dietas con y sin el complejo enzimático. Una posible explicación a esto sería el que la temperatura del medio acuático alcanzada durante el período experimental ($18.4 \pm 0.45^\circ\text{C}$) no fuese la óptima para la de actuación de las fitasas ($35\text{--}40^\circ\text{C}$) añadidas a la dieta. Teniendo en cuenta esto quizá hubiese sido más adecuada la defitinización previa de la soja antes de incluirla en la mezcla a granular, y no esperar a que este proceso ocurriese en el interior del tracto digestivo del animal como fue propuesto por SPINELLI et al. (1979).

En el caso de la dieta S30+Zn, la adición de este mineral no supuso ningún tipo de efecto beneficioso con respecto a la dieta S30, viniendo además acompañado por grandes depósitos grasos puntuales en los hígados de los peces. Atendiendo a la revisión bibliográfica previa, podemos decir que el nivel calculado final de este mineral en la dieta ensayada (200 mg/kg para la dieta S30+Zn), no puede ser considerado como tóxico para los peces (WEKELL et al., 1983). Además según WEKELL et al. (1986) sólo debe ser considerado el posible impacto del uso de elevados niveles de Zn sobre otros metales presentes en la dieta, para valores por encima de 1000 mg Zn/Kg dieta. Por otro lado, según GATLIN y PHILLIPS (1989) niveles de 200 mg Zn/kg dieta proveen suficientes Zn disponible incluso en presencia de grandes concentraciones de fitato. Cabría entonces concluir, según los resultados

obtenidos en el presente experimento, que las posibles uniones Zn-fitico no supusieron el principal problema de la soja en las dietas del Exp. 1. Además, atendiendo a todas estas consideraciones, se podría decir que el Zn contenido en el tratamiento S30+Zn no pudo influir, ni por exceso ni por defecto, en la utilización nutritiva de la dieta.

En cuanto a los resultados histológicos, éstos mostraron un efecto negativo a nivel hepático de la alimentación en aquellos peces alimentados con la dieta S30 en comparación con el Control, de igual forma que ocurriera en el Exp. 1. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de lípidos totales en los hígados, lo cual sugiere que los lípidos existentes se acumulan o concentran en determinadas zonas. Estos resultados coinciden con aquellos de ALEXIS et al., (1985), quienes encontraron que niveles crecientes de soja en dietas para truchas no producían alteraciones bioquímicas hepáticas en truchas de 20 g de peso inicial. Otros autores, sin embargo, observan una reducción en el contenido de lípidos en hígado acompañando la inclusión de soja en las dietas (WATANABE et al., 1992; SHIMENO et al., 1993), mientras que en otros trabajos se han observado resultados en los que la inclusión de soja en el alimento da lugar a un elevado contenido en lípidos, tanto en hígados (ALEXIS, 1990; SHIMENO et al., 1992; VIYAKARN et al., 1992), como en carcasa total (ALEXIS, 1990).

También a nivel intestinal se encontraron diferencias en las disposición de las microvellosidades, lo que podría incidir negativamente en la capacidad de absorción de las mismas para la dieta S30 respecto a la control. Otros autores (VAN den INGH et al., 1991), llegaron a conclusiones semejantes en dietas para salmón atlántico, observando que inclusiones de soja en el pienso no sólo disminuían significativamente el tamaño de las microvellosidades, sino que afectaban enormemente a la organización o disposición de las mismas. Este hecho podría estar relacionado con la presencia de aglutininas de la soja que presentan la característica de depositarse en las membranas del borde piloso de los enterocitos en salmones (HENDRIKS et al., 1990). Por otro lado, HOSSAIN y JAUNCEY (1991), mostraron que estudios histológicos en carpas alimentadas con elevados niveles de fitato en la dieta se caracterizaban por una hipertrofia y vacuolización del citoplasma del epitelio intestinal. En contraste, el mismo tejido en peces alimentados con una dieta control baja en fitatos, contenía células columnares normales con citoplasma granular.

La mejor calidad de los lípidos de la dieta S30+n-3/n-6 con respecto a la S30, favoreció

una mejor utilización de las grasas hepáticas, reduciendo considerablemente las deposiciones lipídicas anormales y otras alteraciones histológicas del tejido hepático. Esta observación podría estar asociada con una relación n-3/n-6 en los fosfolípidos (PL) de las membranas hepáticas más favorables (ACKMAN, 1980), que afectaría sustancialmente al funcionamiento de las mismas (BELL et al., 1986). Además, la mayor importancia relativa de los PUFA dietéticos a su vez podría ejercer un efecto inhibitor de la lipogénesis hepática, como ha sido demostrado en otros vertebrados (JEFFCOAT et al., 1979; SARGENT et al., 1989).

Por otra parte, la mejor composición n-3/n-6 en los PL hepáticos podría favorecer la síntesis de HDL (lipoproteína de alta densidad), principal lipoproteína sérica encontrada en peces (PERRIER et al., 1979), encargada de transportar los lípidos a los tejidos extrahepáticos y formada en un 50% por fosfolípidos (NELSON y SHORE, 1974), incrementando la deposición lipídica en el músculo como se observa en la Tabla 30.

Por otro lado, y de acuerdo con SAKAMOTO y YONE (1978) y SAKAMOTO (1981), las deficiencias de P en las dietas pueden inhibir la beta-oxidación de los ácidos grasos y/o la gluconeogénesis en el pez, resultando en la transformación de las proteínas y/o carbohidratos en lípidos. Así mismo, de acuerdo con estos autores, la activación de la beta-oxidación de los ácidos grasos en el músculo de los peces alimentados con S30+P sería responsable de la reducción en el contenido lipídico del mismo.

Según HENDERSON (1994, comunicación personal), todo este efecto producido por la adición de P a la dieta también podría estar relacionado con la síntesis de fosfolipoproteínas, las cuales al actuar como transportadores a través del torrente sanguíneo podrían incidir sobre la distribución tisular de los lípidos evitando de esta forma la deposición de los mismos en el tejido hepático, como en el caso del tratamiento S30+n-3/n-6.

El resultado de una posible mejora de la utilización de la soja por adición de P a las dietas ha sido obtenido también por otros autores. Así, KETOLA (1975b) encontró que enriqueciendo las dietas que incluyen soja como principal fuente proteica con fosfato dicálcico (3.33% de la dieta), mejoraba el crecimiento de la trucha arco iris, concluyendo que la SBM es una fuente muy pobre de Ca y P. Posteriormente PFEFFER y BECKMANN (1991), corroboraron esta buena utilización de la soja con la adición de P inorgánico en dietas

para esta misma especie. Resultados similares fueron obtenidos por LIEBOWITZ (1981), en alimentos para pez gato.

En resumen, de todos estos resultados se deduce el que únicamente el equilibrio en la relación de ácidos grasos de las series n-3/n-6 y la adición de P a las dietas que incluyen elevados niveles de harina de soja mejoraron las deposiciones lipídicas y alteraciones a nivel histológico en los hígados de los peces.

El hecho de que los resultados de crecimiento y conversión del alimento obtenidos para los peces alimentados con la dieta control no difieran de los obtenidos para los alimentados con la dieta S30, puede ser debido a que el nivel de P resultante o disponible en esta dieta no alcanzara lo que podríamos llamar según HARDY et al. (1991) un nivel clínico, manteniéndose dentro de un nivel subclínico, que según esos autores no tiene obligatoriamente que producir crecimientos inferiores. Por otro lado, SHEARE y HARDY (1987) habían encontrado que esos niveles subclínicos de P en la dieta pueden existir durante un largo período de tiempo en trucha arco iris, antes de que los signos clínicos de deficiencia sean evidentes.

Por último cabría mencionar a la vista de los resultados composicionales, el hecho de que a nivel práctico pueda ser modificado significativamente el contenido graso del pez unicamente variando dos ingredientes en una dieta estandar S30. Así, sobre un contenido de grasa en peso fresco de un 4.30% para los peces alimentados con el tratamiento S30, se puede pasar a peces con un porcentaje de grasa en el músculo de 3.2% ó 6.4% adicionando 6 g/kg de una sal monovalente de P o mejorando el equilibrio n-3/n-6 de la dieta, respectivamente. Este tipo de manipulación sobre el contenido en lípidos del músculo podría tener un cierto interés desde una perspectiva comercial, ya que en última instancia se estaría actuando sobre las propiedades organolépticas del pescado que se vende.

4. EXPERIMENTOS DE UTILIZACION DIGESTIVA DEL ALIMENTO.

4.1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

El análisis de los nutrientes provee una estimación del potencial de las materias primas con el que poder alcanzar unos requerimientos nutricionales determinados a la hora de formular una dieta. Este potencial, sin embargo, tendrá validez sólo si los nutrientes pueden ser digeridos y asimilados por el animal. Por lo tanto, la determinación de los coeficientes de digestibilidad permiten realizar una buena estimación sobre el valor nutricional de una fuente particular de proteína que se pretenda ensayar en dietas para peces o cualquier otro animal.

Con esta finalidad, se diseñaron tres experimentos en cada uno de los cuales se evaluó desde el punto de vista de las digestibilidades que soportan, las diferentes dietas ensayadas en los experimentos anteriores.

4.2. EXPERIMENTO 4. SOJA Y ALTRAMUZ. ¹

4.2.1. INTRODUCCION.

La digestibilidad de la soja, como la de cualquier otra materia prima, depende en gran medida del tratamiento al que haya sido sometida (SANDHOLM et al., 1976), a lo que habría que sumar la propia variabilidad de los métodos empleados para su determinación. De ahí quizá derive como consecuencia principal la diferencia de resultados encontrada en los diferentes trabajos que tratan sobre la utilización de este ingrediente en dietas para peces. Así tenemos que elevados valores de digestibilidad de la proteína de soja han sido mostrados en diferentes especies de peces: 80% y 93% en trucha, (SANDHOLM et al., 1976 y GRABNER y HOFER 1985, respectivamente, 77% para pez gato (AKIYAMA, 1991) y 91% para tilapia (HANLEY, 1987).

WATANABE et al. (1992), encontraron que la sustitución del 50% de la harina de pescado por harina de soja en piensos para seriola, no ocasionaba una disminución aparente de la digestibilidad de las proteínas utilizando el método de las columnas de decantación. Únicamente mostraron diferencias las digestibilidades de la energía con respecto a la dieta control, reflejándose esto en una menor digestibilidad de los lípidos y de los carbohidratos.

HUGHES (1988), encontró que el porcentaje de digestibilidad aparente de las proteínas era mayor para la harina de altramuz que para la harina de soja sin desengrasar, 85.2 y 79.5% respectivamente, cuando se incluían en piensos para **trucha arco iris**. Posteriormente, GOMES y KAUSHIK (1989b) mostraron también en truchas, que la digestibilidad de las proteínas no se vio afectada con niveles de sustitución de hasta un 30% de la harina de pescado por harina de altramuz. Continuando en esta línea PONGMANEERAT y WATANABE (1992), observaron que niveles de harina de soja por encima del 30% en fórmulas para trucha arco iris resultaron en un crecimiento y eficiencia del alimento inferiores al control conteniendo sólo harina de pescado, lo que podría ser atribuido a una menor ingesta de energía digestible en las dietas con harina de soja. Sin embargo, la digestibilidad de la proteína fue alta para todas las dietas, indicando que la soja era bien digerida por esta

(1) Parte de los resultados del presente experimento han sido publicados en la revista *Aquaculture*, 1995, vol. 130: 219-233.

especie. La digestibilidad aparente de los carbohidratos y de la energía en los piensos con harina de soja fue menor que la del control, el cual contenía sólo almidón como fuente de carbohidratos; según estos autores, esto se debió probablemente a la proporción de carbohidratos no digestibles de la harina de soja, que tienden a reducir el contenido en energía digestible de las dietas .

En el caso de juveniles de **lubina**, sustituciones sólo de hasta un 20% de la harina de pescado por harina de soja y gluten de maíz, no afectaron prácticamente a la digestibilidad aparente de las proteínas (ALLIOT et al., 1979).

El coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína de soja desengrasada en *Sciaenops ocellatus* de 200 g, usando Cr_2O_3 como marcador, resultó ser de 62.8%, por debajo de la digestibilidad aparente de la proteína de la harina de pescado (65-70%), según que fuese de alta o baja calidad respectivamente (CASTRO et al., 1993).

En cuanto a la harina de altramuz, son bastantes menos los trabajos que podemos encontrar que hacen referencia a la digestibilidad de este ingrediente proteico en dietas para peces. En **carpas** se determinó para altramuces dulces groseramente troceados una digestibilidad proteica del 84%; en cambio, cuando el fragmento era muy fino, se llegaba incluso hasta el 93%. Del mismo modo, para los carbohidratos se obtuvieron digestibilidades del 50 y 71% según que los altramuces fueran grosera o finamente troceados (MANN, 1948 citado en STEFFENS, 1987).

4.2.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Para la realización de este experimento se utilizaron doradas de 72 g de peso medio inicial repartidas al azar en grupos de 10 peces por tanque, las cuales fueron aclimatadas a los tanques experimentales durante una semana, antes de comenzar con la recogida de heces.

Los peces fueron alimentados cuidadosamente hasta la saciedad, dos veces al día (09:00 y 15:00), durante 21 días, con las dietas experimentales que aparecen en la Tabla 9. Los tanques fueron provistos de un flujo continuo (1 l/min) de agua de mar cuya temperatura osciló entre $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$ a lo largo del período experimental.

La rutina de toma de muestras y el procesado de las mismas se llevó a cabo según se detalla en el Apdo. 2.3.2.1.

4.2.3. RESULTADOS.

La Tabla 32 muestra la composición de las heces obtenidas en el presente experimento. Los valores de digestibilidad aparente, calculados tanto para las proteínas como para los lípidos, resultaron elevados en todas las dietas experimentales oscilando entre el 86% y el 95% en el primer caso y no siendo nunca menor del 92% en el segundo (Tabla 33).

No se observaron diferencias significativas entre los coeficientes de digestibilidad aparente de las proteínas para raciones que incluían altramuza al compararlos con el valor obtenido para la dieta control (Tabla 33). Estos buenos resultados se confirman también al comparar dichos valores con los obtenidos para piensos que incluían harina de soja, los cuales resultaron ser un 10% menores y en algunos casos significativamente bajos (S20 y S30) al ser comparados con la dieta control.

Se comprobó que en casi todas las fórmulas que incluían harina vegetal, la digestibilidad de los lípidos resultaba mayor que la calculada para la dieta control. Este parámetro se mostró menos afectado por el tipo y cantidad de materia prima vegetal utilizada en el pienso, aunque fue posible establecer una correlación positiva entre la cantidad de harina de soja presente en el pienso y la digestibilidad de los lípidos totales (Tabla 33).

Tabla 32. Composición de las heces obtenidas en el experimento de digestibilidad con los piensos experimentales que incluyeron harinas de soja y altramuz.

COMPOSICION (% peso seco)	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
Proteínas	14.11 ^a ±1.61	16.46 ^{ab} ±5.23	25.79 ^c ±1.98	23.43 ^{bc} ±2.98	12.88 ^a ±1.52	15.62 ^a ±0.60	13.49 ^a ±0.22
Lípidos	3.52 ^b ±0.07	3.50 ^b ±0.27	1.80 ^a ±0.21	1.21 ^a ±0.23	1.81 ^a ±0.20	3.71 ^b ±0.66	1.98 ^a ±0.35
Ceniza	34.59 ^{cd} ±0.65	34.92 ^{cd} ±2.47	31.29 ^{bc} ±0.93	35.72 ^d ±1.88	31.82 ^{bc} ±0.87	27.39 ^a ±0.30	28.56 ^{ab} ±0.58
Cr ₂ O ₃	1.30 ^b ±0.10	1.22 ^b ±0.17	0.73 ^a ±0.02	1.10 ^{ab} ±0.21	1.17 ^{ab} ±0.03	1.08 ^{ab} ±0.09	1.03 ^{ab} ±0.29

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Tabla 33. Coeficiente de digestibilidad aparente de las proteínas y lípidos de las dietas experimentales que incluyeron harinas de soja y de altramuz.

	C	S10	S20	S30	A10	A20	A30
ADC Proteínas	92.95 ^{bc} ±0.99	93.63 ^c ±2.76	86.22 ^a ±1.13	87.64 ^{ab} ±3.70	95.49 ^c ±0.56	94.55 ^c ±0.30	92.96 ^{bc} ±1.95
ADC Lípidos	92.59 ^a ±0.43	93.16 ^a ±0.73	95.89 ^{cd} ±0.55	97.51 ^e ±0.34	97.16 ^{de} ±0.26	93.95 ^{ab} ±0.62	95.35 ^{bc} ±0.54

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

4.2.4. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los valores de digestibilidad aparente de las proteínas para los dos grupos de dietas pueden ser considerados como bastante altos en función de los valores recopilados a nivel bibliográfico. El elevado porcentaje de digestibilidad aparente de las proteínas obtenido para el control, en el que todas las proteínas proceden de la harina de pescado concuerda con los resultados que para esa misma fuente proteica han sido encontrados por diferentes autores: 90% para anguila europea (KÜHNE, 1973), 86% para pez gato (BROWN et al., 1985), 89-95% para carpa (OGINO y CHEN, 1973a; KIM, 1974; HOSSAIN y JAUNCEY, 1989), 85-92% para trucha arco iris (OGINO y CHEN, 1973a; GOUVEIA et al., 1991), 95% para doradas (VERGARA, 1992). También los elevados valores de ADC obtenidos para los tratamientos en los que se incluyó harina de altramuiz concuerdan con los que han sido determinados para otras especies tales como la trucha arco iris o la anguila (DE LA HIGUERA et al, 1988; HUGHES, 1988; GOUVEIA et al., 1991; HIDALGO, 1988).

Algunos de estos trabajos comparan la digestibilidad de la soja con la del altramuiz, obteniendo resultados en concordancia con los del presente experimento. Así, en el caso de la carpa y la tilapia, VIOLA et al. (1989) encontraron mejores resultados de utilización del alimento para las dietas que contenían harina de altramuiz (45%), en comparación con las que incluían harina de soja, lo cual, según estos autores, podría ser debido a una mejor digestibilidad de los carbohidratos contenidos en la harina de altramuiz que en los de la harina de soja, lo que se traduciría en un mejor aprovechamiento de la proteína en el primer caso. Por otro lado, HUGHES (1988) encontró que el porcentaje de digestibilidad aparente de las proteínas era mayor para la harina de altramuiz que para la harina de soja sin desengrasar, 85.2 y 79.5% respectivamente, cuando se incluían en piensos para trucha arco iris, aunque posteriormente, GOUVEIA et al. (1991), mostraron que la digestibilidad de la proteína de altramuiz podía llegar hasta el 90% si las semillas eran sometidas a calor/expansión. Para esta misma especie, GOMES y KAUSHIK (1989b) encontraron que la digestibilidad aparente de las proteínas no se veía afectada con respecto a un control con sólo harina de pescado, cuando se sustituía hasta un 20% de esta proteína por proteína de altramuiz (26% en la dieta), mientras que para un 30% de sustitución la digestibilidad de las proteínas resultó significativamente mayor que la del control, 90.2% y 85.7% respectivamente.

Sin embargo todos estos valores de digestibilidad proteica resultaron inferiores a las

obtenidas en el presente trabajo. Esto podría estar relacionado principalmente con la diferentes técnicas usadas para la determinación de los coeficientes. Así, en el caso de HUGHES, el método utilizado fue el de alimentación forzada en cámaras metabólicas, mientras que DE LA HIGUERA y colaboradores realizaron las determinaciones mediante presión abdominal. Ambos métodos han sido rebatidos en diferentes trabajos por proveer estimaciones supuestamente por debajo de las reales. De esta forma, los coeficientes obtenidos por GOMES y colaboradores para la misma especie mediante el mecanismo de CHOUBERT de los coladores rotatorios, resultaron ligeramente superiores. La metodología utilizada en el presente experimento, según se detalla en el Apdo. 2.3.2.1., permitiría realizar unas estimaciones de las digestibilidades aparentes más próximas a las reales que aquellos métodos que implican alguna interferencia en la alimentación y/o defecación natural de los peces objeto de estudio.

Frente a los elevados resultados encontrados para el control y las dietas que contuvieron harina de altramuz, los tratamientos con harina de soja mostraron una relativamente menor digestibilidad aparente de las proteínas, lo cual concuerda con los resultados también significativamente menores de actividad enzimática de las proteasas obtenidos en el experimento previo de engorde. OLLI et al. (1989) y ARNESEN et al. (1989), también mostraron que dietas conteniendo harina de soja, con o sin tostar, resultaron en una baja digestibilidad de las proteínas en trucha y salmon. La explicación de la disminución de la digestibilidad de las proteínas dietéticas con la inclusión de harina de soja en el pienso debe ser atribuída, como se dijo en el experimento de valoración nutritiva de este ingrediente, a otros factores antinutritivos presentes en la soja que no sean la simple presencia de inhibidores de la tripsina, puesto que la actividad determinada para los antitripsicos fue prácticamente despreciable.

En este sentido, SPINELLI et al. (1983) mostraron que los fitatos dietarios representan uno de los principales problemas para la utilización de la soja por los peces, pudiendo llegar a reducir notablemente la digestibilidad de las proteínas en truchas arco iris.

Por otro lado según ATHERTON y AITKEN (1970), el porcentaje de la proteína absorbida que se destina al metabolismo energético puede variar dependiendo de la proporción y calidad en la dieta de otros nutrientes energéticos. De esta manera, también se debe tener en cuenta el que la presencia de materias primas de origen vegetal en las dietas,

aporta normalmente grandes cantidades de azúcares complejos, celulosas o hemicelulosas, que contribuyen a aumentar los desechos fecales derivados de su ingestión (KAUSHIK, 1990).

En este sentido, quizá una de las explicaciones más sencillas en relación a esta disminución de la digestibilidad de las proteínas en las dietas a base de soja pudiera estar en relación con el contenido en carbohidratos de la misma, los cuales parecen tener una elevada proporción de carbohidratos no digestibles por los animales monogástricos. De esta forma este material hidrocarbonado pasaría realmente a formar parte o a engrosar la proporción de fibra indigestible de las dietas (ARNESEN et al., 1989; OLLI et al., 1989).

Los oligosacáridos pueden comprender más de un 10% de las semillas de leguminosas, entre ellas las de la soja y el altramuiz. Según ARNESEN et al. (1989), prácticamente todos los oligosacáridos de la soja pueden ser considerados como fibra, de acuerdo con la definición dada por TROWELL et al. (1976) quienes consideraron como fibra dietaria a la proporción de las plantas que no puede ser digerida por los enzimas digestivos en el canal alimentario del animal, no pudiendo por tanto ser absorbida del intestino. De acuerdo con esto, SCERBINA (1973) trabajando con carpas encontró que de los carbohidratos contenidos en la soja (25.4% en peso seco), la digestibilidad de los mismos era del 51%, mientras que para el altramuiz, con un contenido del 22.8% la digestibilidad fue del orden del 57%. También VIOLA et al. (1989), parecen estar de acuerdo con esta teoría, concluyendo estos autores que el hecho de que la digestibilidad de los carbohidratos del altramuiz sea más alta que los de la soja, puede influir en los buenos resultados para la utilización de las proteínas en los piensos de altramuiz. De forma similar podrían ser explicados los resultados obtenidos en el presente experimento.

Según SMITH y LOVELL (1973), elevadas cantidades de fibra bruta influyen perjudicialmente sobre la digestibilidad de las proteínas. La fibra que forma parte de las paredes celulares de las plantas puede actuar por una parte como aislante entre los nutrientes y el medio digestivo, y por otra como inhibidores frente a la actuación de los enzimas digestivos disminuyendo así la actuación de los mismos. En este último modo de actuación la fibra puede unirse a los enzimas por mecanismos de absorción (KROGDAHL, 1989). Además, HILTON y ATKINSON (1982) demostraron que tasas crecientes de fibra bruta, aceleran el tiempo de vaciado estomacal, haciendo que la digestibilidad de la materia seca

descienda. TAKII et al. (1989) de acuerdo con ello, concluyeron que para la digestión de la soja por la seriola se requiere un mayor tiempo que para la harina de pescado. Por otro lado, GOMES y KAUSHIK (1989b) y WATANABE et al. (1992), observaron una disminución en la energía digestible de las dietas a medida que aumentaba el nivel de inclusión de materias primas vegetales. ANDERSON et al. (1991) profundizando aún más sobre este tema, encontraron que la energía digestible de distintas materias primas disminuye conforme aumenta su contenido en fibra.

En cuanto a la mejora en la digestibilidad de los lípidos dietarios observada con la inclusión de harinas vegetales, este efecto podría estar relacionado con las diferencias en cuanto a composición de ácidos grasos de las fuentes lipídicas utilizadas. Como se puede observar en las tablas de los Anexos I y II, un 51.43% de los ácidos grasos provenientes de la harina de pescado utilizada son saturados, mientras que en las harinas de soja y altramuz sólo alrededor de un 13-15% de sus ácidos grasos son saturados. También el contenido en grasas saturadas del aceite de sardina es menor que el de la harina de pescado. Las grasas saturadas, con puntos de fusión elevados son menos digestibles por los peces que las poliinsaturadas (PHILLIPS, 1969; WATANABE, 1982). TAKEUCHI et al. (1979), mostraron cómo la digestibilidad de las grasas para carpa y trucha arco iris disminuía a medida que su punto de fusión y su grado de saturación incrementaban. Este efecto era potenciado con la disminución en talla de los peces por debajo de los 50 g. Sin embargo, en dichas experiencias no se observó un efecto negativo de las grasas saturadas en el crecimiento, supervivencia o utilización nutritiva de las proteínas dietarias por los peces, en concordancia con los resultados del presente experimento. Por otra parte, estudios recientes (KOVEN et al., 1994) sugieren una especificidad enzimática para la hidrólisis de ácidos grasos poliinsaturados y una absorción más efectiva de éstos ácidos grasos que de saturados o monoinsaturados. En efecto, la harina de soja tiene cerca de un 47% de poliinsaturados frente al 27% de la harina de pescado, lo que podría potenciar el incremento gradual de la digestibilidad de los lípidos encontrados en las dietas con soja.

Por último, cabría mencionar el hecho de que las mejores digestibilidades de la grasa observadas en los tratamientos con soja pudieran haber contrarrestado de alguna forma la mala utilización digestiva de los carbohidratos contenidos en la harina de soja (BECKER y NEHRING, 1965; SCERBINA, 1973; ARNESEN et al., 1989), haciendo que los resultados finales de utilización del alimento no fuesen tan malos como era de esperar.

4.3. EXPERIMENTO 5. GLUTEN DE MAIZ Y HARINA DE CARNE Y HUESOS.

4.3.1. INTRODUCCION.

Los valores de digestibilidad para la proteína de gluten de maíz determinados en diversas especies han sido en general elevados, encontrándose valores entre un 91% y 96% para carpa y trucha respectivamente. Sin embargo para esas mismas especies la digestibilidad para la harina de carne y huesos ha sido menor en cualquier caso (54% a 78%). Estos menores valores para la harina de carne y huesos están en estrecha relación con la propia variabilidad intrínseca en la composición de esta materia prima. Todo ello queda reflejado en las digestibilidades obtenidas cuando estas dos materias primas son utilizadas como única fuente proteica en las dietas.

Así, PONGMANEERAT y WATANABE (1991) observaron que el valor de digestibilidad aparente de las proteínas en dietas para carpa que contenían harina de gluten de maíz como única fuente proteica fue excelente, siendo incluso superior al de la harina de pescado, a pesar de los pobres resultados en crecimiento y utilización del alimento en los peces alimentados con gluten de maíz.

Sin embargo, la evaluación de la calidad de la harina de carne y huesos en dietas experimentales para trucha arco iris usándola como única fuente de proteína (WATANABE y PONGMANEERAT, 1991), dio lugar a una digestibilidad de las proteínas bastante baja, como también encontraron PONGMANEERAT y WATANABE (1991) en dietas para carpa.

Por otro lado, son muy pocos los trabajos que hacen referencia a la utilización digestiva de estas dos fuentes proteicas como sustitutos parciales de la harina de pescado en dietas para peces, aunque la utilización nutritiva de las mismas aparece mejor documentada, dando en general bastante buenos resultados en los dos casos para niveles de inclusión menores del 40% en diferentes especies.

ALLIOT et al. (1979) encontraron que sustituciones de hasta un 20% de la harina de pescado por gluten de maíz no afectaron prácticamente a la digestibilidad aparente de las proteínas en juveniles de lubinas.

4.3.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

En el desarrollo del presente experimento se introdujeron modificaciones respecto al ensayo similar realizado con harinas de soja y altramuiz: Por una parte se acortó el período de recogida de heces y por otro se redujo el tiempo de decantación de las mismas en la columna de sedimentación, reduciendo así las posibilidades de que su composición resultara modificada. Para conseguir ésto se aumentó el flujo medio de agua en los tanques hasta unos 6 l/min., lo que indirectamente permitió instalar en los tanques un mayor número de peces.

En este experimento se emplearon dos tanques por tratamiento albergando cada uno de ellos 25 peces de un peso medio comprendido entre 34 y 37 g/pez. La alimentación se realizó "ad libitum" dos veces al día (10:00; 15:00), 7 días por semana, durante 21 días, con las dietas experimentales formuladas según la Tabla 34. Los valores medios de pH, T y O₂ determinados durante el ensayo fueron de 6.8, 22.7°C y 7.7 mg/l, respectivamente.

4.3.3. RESULTADOS.

La Tabla 35 muestra la composición en peso seco de las heces obtenidas de los peces alimentados con las dietas ensayadas en el presente experimento. El análisis de la composición de las heces puso de manifiesto un contenido en proteínas mucho más elevado para los peces de los tratamientos con harina de carne y huesos que para los del gluten de maíz, siendo la composición de estas últimas muy similar a la de la dieta control.

La composición en lípidos fue muy similar en las heces obtenidas para todos los tratamientos, resultando ser un poco mayor para las dietas M30 y M40. Por último, también fueron apreciadas diferencias notables en las cenizas, cuyo contenido fue superior para los piensos que contuvieron harina de carne y huesos.

Tabla 34. Formulación y composición de las dietas ensayadas en el experimento de digestibilidad con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.

INGREDIENTES (% peso húmedo)	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Harina de pescado	60.25	48.20	42.17	36.17	48.20	42.17	36.17
Harina de gluten de maíz	-	10.54	15.81	21.08	-	-	-
Harina de carne y huesos	-	-	-	-	14.04	21.06	28.09
Aceite de pescado	7.35	8.29	8.74	9.21	8.29	8.74	9.21
Almidón de maíz	16.15	16.15	16.15	16.15	16.15	16.15	16.15
Dextrina	5.38	5.38	5.38	5.38	5.38	5.38	5.38
Vitaminas ¹	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Minerales ²	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cr ₂ O ₃	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
CMC ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α-Celulosa	5.87	6.44	6.75	7.01	2.94	1.05	0.00
COMPOSICION (% peso seco)							
Humedad	7.47	7.76	9.32	10.08	7.86	9.87	6.59
Proteínas	45.00	45.78	46.35	50.37	48.62	47.44	46.90
Lípidos	13.00	12.88	12.52	11.71	13.65	14.92	16.82
Ceniza	11.84	10.25	9.27	8.92	13.64	14.07	14.78
Fibra	6.59	7.49	7.75	6.35	4.29	3.35	2.03

Tabla 35. Composición de las heces obtenidas en el experimento de digestibilidad con los piensos experimentales que incluyeron harinas de gluten de maíz y carne y huesos.

COMPOSICION (% peso seco)	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
Proteínas	10.57 ^a ±0.62	10.78 ^a ±1.52	10.65 ^a ±1.02	9.98 ^a ±0.86	18.26 ^b ±1.84	20.90 ^b ±3.93	23.37 ^b ±5.31
Lípidos	3.71 ^a ±0.37	4.39 ^{abc} ±0.30	4.73 ^{abc} ±0.50	3.58 ^a ±0.25	4.06 ^{ab} ±0.39	4.94 ^{bc} ±0.86	5.47 ^c ±0.67
Ceniza	32.40 ^b ±0.86	31.89 ^b ±0.18	26.76 ^a ±1.95	27.52 ^a ±1.35	37.11 ^c ±3.09	40.38 ^c ±2.00	37.18 ^c ±0.43
Cr ₂ O ₃	1.35 ^{bc} ±0.26	1.54 ^c ±0.20	1.07 ^{ab} ±0.18	1.28 ^{bc} ±0.22	1.16 ^{abc} ±0.12	1.14 ^{abc} ±0.25	0.83 ^a ±0.22
Energía (Kj/g)	11.15 ^{ab} ±0.28	11.42 ^{abc} ±0.10	12.45 ^d ±0.22	11.92 ^{bcd} ±0.22	11.04 ^a ±0.34	11.29 ^{abc} ±0.87	11.91 ^{cd} ±0.11

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Tabla 36. Coeficiente de digestibilidad aparente de las proteínas y lípidos y energía digestible de las dietas experimentales que incluyeron harinas de gluten de maíz y carne y huesos.

	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
ADC Proteínas	90.47 ^c ±1.95	92.00 ^c ±0.63	88.55 ^c ±0.88	91.65 ^c ±0.61	82.87 ^b ±1.16	79.09 ^{ab} ±0.49	75.04 ^a
ADC Lípidos	87.37 ^a ±0.34	88.38 ^a ±0.12	82.86 ^a ±8.22	87.23 ^a ±0.25	86.41 ^a ±0.09	84.37 ^a ±0.52	81.69 ^a
DE (Kj/g)	13.67 ^a ±0.79	13.65 ^a ±0.29	11.22 ^a ±1.12	12.96 ^a ±0.09	12.82 ^a ±0.42	11.70 ^a ±0.58	11.24 ^a
DE (%)	75.44 ^a ±4.37	77.75 ^a ±1.65	64.20 ^a ±6.44	71.42 ^a ±1.93	71.74 ^a ±2.38	68.42 ^a ±3.39	64.08 ^a
D total (%)	59.62 ^a ±5.50	65.84 ^a ±2.33	49.84 ^a ±7.95	58.19 ^a ±1.48	54.26 ^a ±2.23	51.91 ^a ±8.35	47.00 ^a

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

En base a las anteriores determinaciones, se calcularon las digestibilidades de proteína y lípidos para las distintas dietas experimentales (Tabla 36). No se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de digestibilidad aparente de las proteínas de la dieta control y aquellas que incluyeron gluten, pero sí se comprobó que los valores obtenidos para la proteína de las dietas que incluían harina de carne eran significativamente menores que el resto, además de disminuir también conforme se incrementaba el nivel de inclusión de esta materia prima en el pienso. La digestibilidad aparente de los lípidos, en cambio, no se vio afectada por el tipo o cantidad de ingrediente alternativo utilizado.

Se puede concluir que la digestibilidad de los macronutrientes, especialmente la proteína, se vio afectada negativamente al utilizar niveles elevados (30 ó 40% de la proteína) de harina de carne y huesos en el pienso.

4.3.4. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en el presente experimento se deduce una mejor utilización digestiva de las dietas que incluyeron harina de gluten de maíz, similares a la del control, con respecto a las que incluyeron harina de carne y huesos, resultados que están en concordancia con los que se muestran en otros trabajos.

En el caso del gluten de maíz, PONGMANEERAT y WATANABE (1991) encontraron para carpa una digestibilidad aparente de la proteína más alta que la de la harina de pescado (95% y 87% respectivamente). Otros autores han manifestado el buen uso digestivo de la proteína de gluten en diferentes especies de peces (HASTING, 1966; CHO et al., 1982; ANDERSON et al. 1992; MOYANO, 1992; MORALES, 1993). Por el contrario, la menor utilización digestiva de la harina de carne y huesos queda también patente en otros muchos trabajos. Así, PONGMANEERAT y WATANABE (1991) encontraron que, en piensos para carpa, la digestibilidad de esta materia prima estaba muy por debajo de la de la harina de pescado, 54% y 84% respectivamente. En el caso de la trucha arco iris (WATANABE y PONGMANEERAT, 1991), los valores medidos para la digestibilidad de las proteínas fueron de 78% y 92% para el harina de carne y huesos y harina de pescado respectivamente, en contraposición con el valor del 60% obtenido por ALEXIS et al. (1988), para esta misma especie.

También CASTRO et al. (1993) encontraron que en *Sciaenops ocellatus* de 200 g de peso medio, la digestibilidad aparente de la proteína de harina de carne y huesos era del 52.6% en un pienso compuesto por 30% de esta materia prima y 70% de una dieta de referencia.

Todo ello concuerda con los resultados encontrados en el presente trabajo en el cual, aunque no se determinó la digestibilidad de las materias primas por separado sino del conjunto de la dieta, resultó evidente que la digestibilidad aparente de la proteína de la harina de carne y huesos fue menor que la del gluten y ésta a su vez menor que la de la harina de pescado, en función de la disminución en la digestibilidad global encontrada para este nutriente en las dietas, con el aumento del nivel de sustitución en las mismas por las fuentes proteicas alternativas.

Estas diferencias en la digestibilidad de la proteína entre las dos materias primas alternativas ensayadas no deben ser atribuidas a posibles diferencias en la ingesta, pues son muchos los autores que han señalado que la digestibilidad de las proteínas de una dieta determinada es independiente de la ingesta proteica (NOSE, 1967; OGINO y CHEN, 1973; PAGE y ANDREWS, 1973; WINDELL et al., 1978b; RYCHLY y SPANNHOF, 1979).

Los buenos resultados derivados de la utilización del gluten de maíz parecen estar relacionados en principio con el propio mecanismo de fabricación de dicho producto. El gluten de maíz, como ya se ha comentado, es un subproducto que se obtiene tras un tratamiento hidrotérmico de la semilla, seguido del machacado de la misma. Este tipo de proceso puede incrementar la disponibilidad de los aminoácidos presentes en el producto resultante. Por otro lado, también se puede ver favorecida la digestibilidad del poco almidón contenido en el gluten, debido al calentamiento a que es sometida la harina. Todos estos factores pueden contribuir a explicar la elevada disponibilidad de los nutrientes de esta materia prima (SCOTT et al., 1982), cuando se usa en dietas para peces.

Por otro lado, los peores valores digestivos que ocasiona la inclusión de harina de carne y huesos en los piensos podrían estar relacionados con el elevado nivel de cenizas contenido en este ingrediente (25-30% en peso seco). Proporciones muy altas de ceniza en el alimento han sido correlacionadas inversamente con las digestibilidades de las proteínas en las mismas

(NOSE y MAMIYA, 1963; NRC, 1983; PONGMANEERAT y WATANABE, 1991). De acuerdo con ésto, en el presente experimento se pudo establecer una clara relación negativa entre el contenido en cenizas de las dietas y la digestibilidad de las proteínas (Fig. 26).

Por otro lado, al igual que en el experimento anterior con harinas de soja y altramuiz, la disminución progresiva de la digestibilidad de los lípidos dietéticos al aumentar los niveles de harina de carne y huesos en el pienso, puede estar en parte relacionada con el contenido creciente en ácidos grasos saturados provenientes en este caso de la harina de carne, que a su vez no tienen por qué afectar al crecimiento y utilización nutritiva del alimento (TAKEUCHI et al., 1979). En efecto, el componente mayoritario de las grasas de carne y huesos son ácidos grasos saturados (WATANABE, 1982; NRC, 1983) y, como se discutió en el apartado anterior, la digestibilidad de los lípidos en las dietas para peces disminuye al incrementar el punto de fusión de los mismos (TAKEUCHI et al., 1979).

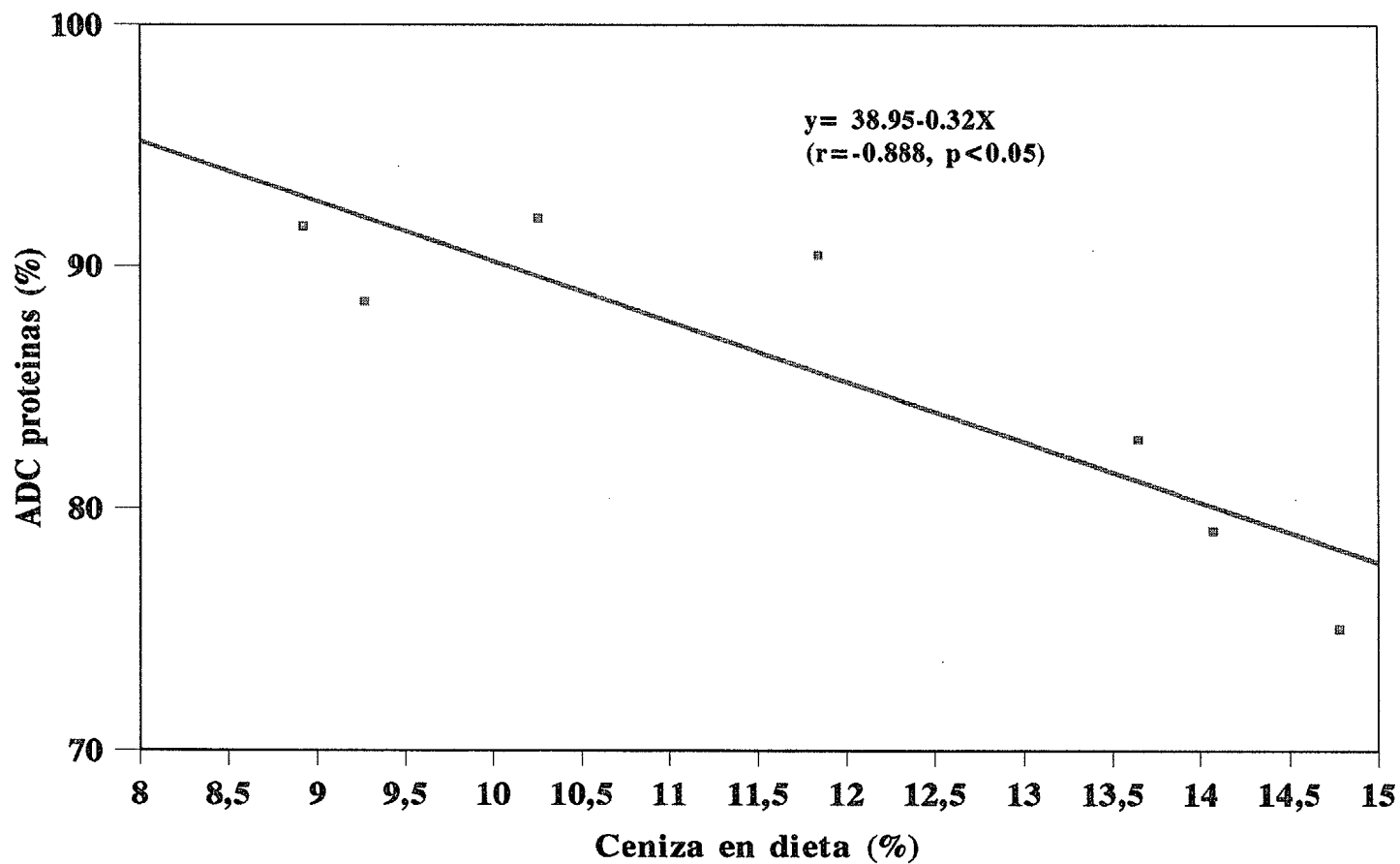


Fig. 26. Relación entre la composición en ceniza de las dietas y la ADC de las proteínas en el experimento de gluten y carne.

4.4. EXPERIMENTO 6. MEJORA DE SOJA.

4.4.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Para la realización del presente ensayo fueron utilizadas doradas de 55 g de peso medio inicial, las cuales se repartieron al azar en grupos de 15 peces en los tanques experimentales, donde fueron alimentadas cuidadosamente dos veces al día (10:00 y 16:00) con los piensos cuya formulación y composición se muestran en la Tabla 37.

Los tanques fueron provistos de un flujo constante de agua de mar de 6 l/min. El experimento se prolongó durante 15 días, en los cuales los valores medios de T y concentración de O₂ oscilaron entre 17.7-17.8 y 7.0-7.8, respectivamente.

4.4.2. RESULTADOS.

La cuantificación diaria de las heces recogidas para cada tanque, en peso seco una vez liofilizadas, se muestra en la Tabla 38 junto con los datos de ingestión diaria para cada uno de los tratamientos.

Se puede observar que tanto las ingestas totales como las ingestas medias diarias expresadas en porcentaje del peso, fueron similares independientemente de los tratamientos experimentales. Por el contrario, si que existieron diferencias en la cantidad de heces recogidas, siendo éstas mayores en los peces alimentados con el control respecto a las demás dietas; sin embargo, hay que considerar el hecho de las grandes variaciones que se tuvieron para las desviaciones estandar de estos valores.

Tabla 37. Formulación y composición de las dietas ensayadas en el experimento de digestibilidad de mejora de la harina de soja.

INGREDIENTES (% peso húmedo)	C	S30	S30 + P	S30 + Zn	S30 + Fitasas	S30 + n-3/n-6
Harina de pescado	61.80	42.50	42.50	42.50	42.50	42.50
Harina de soja	-	29.60	29.60	29.60	29.60	29.60 ⁴
Aceite de pescado	6.60	7.30	7.30	7.30	7.30	8.00
Almidón de maíz	12.07	12.07	8.01	12.07	12.07	12.07
Dextrina	4.03	4.03	2.68	4.03	4.03	4.02
Vitaminas ¹	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Minerales ²	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31
CMC ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α -Celulosa	11.69	0.69	-	0.66	0.67	-
P[KH ₂ PO ₄]	-	-	6.10 ⁵	-	-	-
Zn [ZnSO ₄ • 7H ₂ O]	-	-	-	0.03 ⁵	-	-
Fitasas	-	-	-	-	0.02 ⁵	-
Cr ₂ O ₃	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
COMPOSICION (% peso seco)						
Humedad	5.50	7.24	6.54	8.95	7.11	8.47
Proteínas	46.79	48.40	47.55	48.28	47.53	48.15
Lípidos	11.20	10.94	10.95	11.02	11.03	11.47
Ceniza	11.92	11.16	16.26	11.28	11.14	11.25
Fibra	11.70	4.22	3.39	3.90	3.79	3.11
Carbohidratos ⁶	10.61	16.16	13.91	15.03	16.07	15.86
Energía bruta (Kj/g)	19.01	19.39	18.40	18.82	19.42	19.31

(1) y (2) Composición de las mezclas en la Tabla 7.

(3) Carboximetil celulosa.

(4) Harina de soja desengrasada.

(5) Cantidad añadida a expensas de la α -celulosa de la mezcla de minerales.

(6) Determinados analíticamente.

Tabla 38. Cuantificación media diaria de heces y de alimento ingerido para cada uno de los tratamientos ensayados en el experimento de digestibilidad de mejora de la harina de soja.

	C	S30	S30+P	S30+Zn	S30+Fitasas	S30+n-3/n-6
Ingesta (g)	224.3 ^a ±14.8	186.8 ^a ±34.3	174.4 ^a ±12.8	183.6 ^a ±9.65	181.2 ^a ±9.57	192.4 ^a ±15.86
Ingesta diaria (% peso)	2.51 ^a ±0.21	2.04 ^a ±0.26	1.98 ^a ±0.13	1.99 ^a ±0.08	2.00 ^a ±0.09	2.14 ^a ±0.10
Heces (g.p.seco/día)	1.40 ^c ±0.44	0.98 ^b ±0.57	0.46 ^a ±0.20	0.73 ^{ab} ±0.38	0.47 ^a ±0.26	0.55 ^a ±0.33

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Tabla 39. Composición (g/100 g peso seco) y contenido en energía de las heces obtenidas para los distintos tratamientos ensayados en el experimento de digestibilidad de mejora de la harina de soja.

	C	S30	S30+P	S30+Zn	S30+Fitasas	S30+n-3/n-6
Proteínas	11.79 ^a ±0.23	12.60 ^b ±0.55	14.08 ^c ±0.54	12.66 ^b ±0.39	12.46 ^b ±0.46	12.72 ^b ±0.55
Lípidos	5.05 ^a ±0.49	7.05 ^c ±0.27	5.50 ^{ab} ±1.31	6.62 ^{bc} ±0.61	7.19 ^c ±0.71	7.15 ^c ±0.25
Carbohidratos	2.68 ^a ±1.00	17.38 ^c ±1.01	7.66 ^b ±1.44	18.44 ^c ±2.57	16.93 ^c ±1.44	19.11 ^c ±1.41
Ceniza	33.14 ^a ±0.74	32.03 ^a ±0.29	41.83 ^b ±0.80	31.20 ^a ±1.54	31.59 ^a ±1.59	31.73 ^a ±1.58
Cr ₂ O ₃	1.02 ^a ±0.14	1.11 ^a ±0.17	1.19 ^a ±0.09	1.00 ^a ±0.42	1.28 ^a ±0.13	1.28 ^a ±0.14
Energía (Kj/g)	11.65 ^b ±0.66	12.19 ^b ±0.26	9.43 ^a ±0.71	11.96 ^b ±0.63	11.78 ^b ±0.47	11.94 ^b ±0.61

* Valores en una misma línea con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

La composición de las heces se muestra en la Tabla 39. El contenido en proteínas resultó significativamente más bajo para el control que para el resto de los tratamientos, ocurriendo todo lo contrario con las heces obtenidas para los peces alimentados con el pienso S30+P. Por otro lado, la composición en lípidos y carbohidratos mostró una tendencia similar, resultando las heces de las dietas control y S30+P con un porcentaje más bajo de estos dos macronutrientes, en comparación con el resto de los piensos. El contenido en ceniza fue muy homogéneo para las diferentes fórmulas ensayadas, a excepción de la S30+P que fue significativamente más alto.

Todos estos resultados concuerdan completamente con las digestibilidades calculadas para las proteínas, lípidos, carbohidratos y energía de los distintos tratamientos (Tabla 40).

Los coeficientes de digestibilidad aparente de las proteínas, lípidos y energía resultaron estadísticamente similares para todas las dietas experimentales. Por el contrario, si que se observaron diferencias significativas claras en el caso de los carbohidratos observándose dos grupos de valores: uno muy superior correspondiente a las dietas control y S30+P, y otro inferior en el que se incluirían el resto de las dietas.

Tabla 40. Coeficientes de digestibilidad aparente, energía digestible y digestibilidad total para los diferentes tratamientos ensayados en el experimento de mejora de la harina de soja.

	C	S30	S30+P	S30+Zn	S30+Fitasas	S30+n-3/n-6
ADC proteínas (%)	90.81 ^a ±1.23	91.23 ^a ±0.85	90.16 ^a ±0.53	90.76 ^a ±1.61	91.95 ^a ±0.60	91.86 ^a ±0.80
ADC lípidos (%)	83.30 ^a ±3.22	78.16 ^a ±2.29	83.25 ^a ±4.54	77.24 ^a ±4.52	79.49 ^a ±1.21	80.80 ^a ±3.02
ADC carbohidratos (%)	90.90 ^c ±2.20	65.12 ^{ab} ±5.35	81.70 ^{bc} ±2.93	53.27 ^a ±16.05	67.81 ^{ab} ±3.74	62.88 ^a ±6.15
DE (Kj/g)	14.77 ^a ±0.44	15.27 ^a ±0.22	15.26 ^a ±0.28	14.46 ^a ±1.15	15.82 ^a ±0.30	15.63 ^a ±0.60
DE (%)	77.69 ^a ±2.31	78.73 ^a ±1.11	82.93 ^a ±1.53	76.81 ^a ±6.12	81.48 ^a ±1.55	80.94 ^a ±3.10
D total (%)	64.43 ^a ±5.52	66.15 ^a ±2.42	66.75 ^a ±0.58	64.21 ^a ±7		

4.4.3. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los resultados indican que las ingestas, expresadas tanto en gramos de peso seco como en porcentaje del peso corporal día fueron bastante altas y muy homogéneas para los distintos tratamientos, siendo los valores adecuados para la especie y tamaño de los peces experimentales. La dieta S30+P, lo mismo que ocurrió en el ensayo previo de engorde, presentó una aceptación menor por los peces durante los primeros días de experimentación, recuperándose seguidamente hasta alcanzar el nivel de ingesta observado para el resto de los piensos.

En cuanto a la cantidad de heces recogidas, los pesos medios variaron notablemente tanto entre diferentes tratamientos, como entre los distintos días para un mismo tratamiento, siendo los menores obtenidos de 0.42 g peso seco/día para los peces alimentados con el tratamiento S30+P y los mayores de 1.40 g peso seco/día para el control, lo cual estaría en cierta medida en concordancia con las relativamente más altas ingestas obtenidas para esas dietas. Las diferencias en la cantidad de heces recogidas indican, probablemente, una diferente densidad de las heces, provocada por los diferentes ingredientes con que se formularon las dietas. Se podría pensar, en principio, que estas cantidades no fueran suficientes de acuerdo con el volumen de dieta ingerida; sin embargo, si expresamos la cantidad de excretas recogidas diariamente como gramos de heces en peso húmedo por kg de animal, los valores resultantes (considerando una humedad para las mismas del 75-80%) son similares al valor máximo orientativo que CHO y colaboradores obtuvieron para el Sistema Guelph original (1g/kg peso).

Los resultados de los coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas y lípidos obtenidos en el presente experimento para las dietas Control y S30, corroboran aquellos elevados valores que se mostraron en el Exp. 1. Se compr

ingredientes proteicos como del propio aceite de pescado utilizados en la elaboración de los piensos, ya que ni uno ni otro fueron los mismos para los dos experimentos.

Merecen especial mención, por cuanto que en el experimento previo no se pudieron analizar, las digestibilidades aparentes de los carbohidratos. Esta fracción de las dietas es la que más se vió influida por los diferentes tratamiento. Así, se tuvieron los mayores valores para el control, rondando el 90%, mientras que todos los piensos que incluyeron harina de soja vieron mermada notablemente la digestibilidad de sus carbohidratos. Todo ello evidentemente podría estar relacionado con la composición en carbohidratos no digestibles o parcialmente digestibles contenidos en la soja (COWEY et al., 1971; ARNESEN et al., 1989; SAINI, 1989; PFEFFER y BECKMANN, 1991), como se comentó en la discusión del experimento previo de utilización nutritiva de esta harina. Otros autores, entre ellos WATANABE et al. (1992), encontraron también que con elevados niveles de inclusión de soja en el pienso no se alteraba la digestibilidad de las proteínas con respecto a una dieta control con sólo harina de pescado, mientras que la digestibilidad de los carbohidratos si que se veía disminuída enormemente.

De todos los ingredientes o tratamientos con los que se intentó mejorar la utilización de la harina de soja, la adición de P inorgánico fue la que pareció influir en mayor medida sobre la utilización digestiva de la dieta S30 y concretamente sobre la digestibilidad de los carbohidratos de la misma.

De acuerdo con HENDERSON (comun. pers.), la mejora en la utilización digestiva de la dieta S30 como consecuencia de la adición de P en la forma de fosfato, pudiera estar relacionada a nivel del tracto digestivo con un efecto buffer del fosfato añadido, de tal forma que se vean favorecidos los procesos de hidrólisis de los constituy

de SPINELLI y colaboradores (1983), y HOSSAIN y JAUNCEY (1991), quienes demostraron que un alto contenido en fitatos condicionaba principalmente la disponibilidad de las proteínas, vemos que no es precisamente el caso encontrado en la dieta S30 ensayada en estos experimentos, puesto que las digestibilidades aparentes obtenidas para las proteínas fueron bastante altas de acuerdo con la revisión bibliográfica previa. Atendiendo a esto, en principio podríamos rebajar importancia a la influencia de los fitatos sobre la utilización de las proteínas, y centrarnos más en la importancia que a nivel digestivo y/o metabólico pudiera dejar de tener el P que aparece unido al ácido fítico. En este sentido, resultaría conveniente seguir investigando con el uso de fitasas exógenas, que por otra parte han dado muy buenos resultados en otros trabajos (BROWN, 1991; RODEHUTSCORD y PFEFFER, 1994a; SCHÄFER et al., 1994).

Como se mostró en la introducción general, la investigación con enzimas exógenas es un área relativamente reciente en estudios relacionados con la nutrición de peces. Sin embargo, los resultados que pudieran conllevar el uso de fitasas a nivel comercial en los piensos serían prometedores por cuanto que, aunque según se ha podido comprobar (CAMPBELL y BEDFORD, 1992), las mejoras en la digestibilidad no son muy altas, la correspondiente reducción en las excreciones de P fecal si son considerables.

Según SCHÄFER et al. (1994), el uso de fitasas mejora la utilización del P procedente de ingredientes vegetales reduciendo las excreciones de este nutriente en un 30% comparado con las dietas en las que para alcanzar los requerimientos de P se suplementa con fosfato monocalcico.

se desprende que la adición de niveles apropiados de P a las dietas que contienen elevadas cantidades de soja puede, efectivamente, mejorar la utilización de las mismas, resultaría más apropiado desde el punto de vista de la actual problemática medioambiental, ya que la excreción de P está en relación directa con la ingesta del mismo (NAKASHIMA y LEGGETT, 1980), el uso de cualquier otro constituyente del tipo de las fitasas, que pudiera mejorar la utilización del P sin necesidad de añadir estos perjudiciales suplementos minerales a las dietas.

5. EXPERIMENTOS DE EXCRECION DE AMONIO.

5.1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

La proporción de nitrógeno dietario que es excretado o retenido depende inicialmente de la eficacia de asimilación del propio organismo, pero además se sabe que también varía con la composición de la dieta (ELLIOT, 1976a; PAULSON, 1980; RYCHLY, 1980; BEAMISH y THOMAS, 1984; KAUSHIK y OLIVA TELES, 1985; KAUSHIK y COWEY, 1991), tamaño del alimento (ELLIOT, 1976b; DURBIN y DURBIN, 1981), y condiciones medioambientales (NIIMI y BEAMISH, 1974).

Existen numerosos trabajos sobre la influencia del nivel de proteína en la dieta y la excreción total de N producida por la misma, estando generalmente correlacionados directamente (COULTON, 1978; GARCIA et al., 1981; CARDENETE y MOYANO, 1988; FORSBERG y SUMMERFELT, 1992; CHAKRABORTY, 1992). Sin embargo, se puede decir que no hay prácticamente trabajos en los que se estudie la excreción de N en función del tipo de proteína dietaria.

La calidad de una proteína dietaria generalmente se evalúa en función de su composición en aminoácidos esenciales, de tal forma que, si la composición en aminoácidos esenciales presenta deficiencias, excesos o desequilibrios con respecto a los requerimientos del pez, puede reducirse considerablemente la eficacia en la utilización del alimento por el animal, pudiendo provocar un aumento en la excreción amoniacal (OGINO

Una completa valoración de nuevas fórmulas alimenticias para peces debe considerar no sólo la valoración nutricional de las mismas, sino también las posibles descargas de nutrientes al medio como resultado de su utilización. Esto es particularmente importante cuando se trata de evaluar una nueva combinación de fuentes proteicas, puesto que cualquier desequilibrio en la composición en aminoácidos puede resultar en una activa desaminación y por consiguiente, elevados niveles de excreción de amonio al medio.

El objetivo de estos experimentos, por tanto, consiste en completar el estudio de la sustitución parcial de la proteína de pescado por las cuatro fuentes proteicas alternativas ensayadas en los experimentos anteriores desde el punto de vista nutricional y digestivo, haciendo una evaluación del efecto producido por esas sustituciones sobre la liberación de nitrógeno al medio.

5.2. EXPERIMENTO 7. SOJA Y ALTRAMUZ. ¹

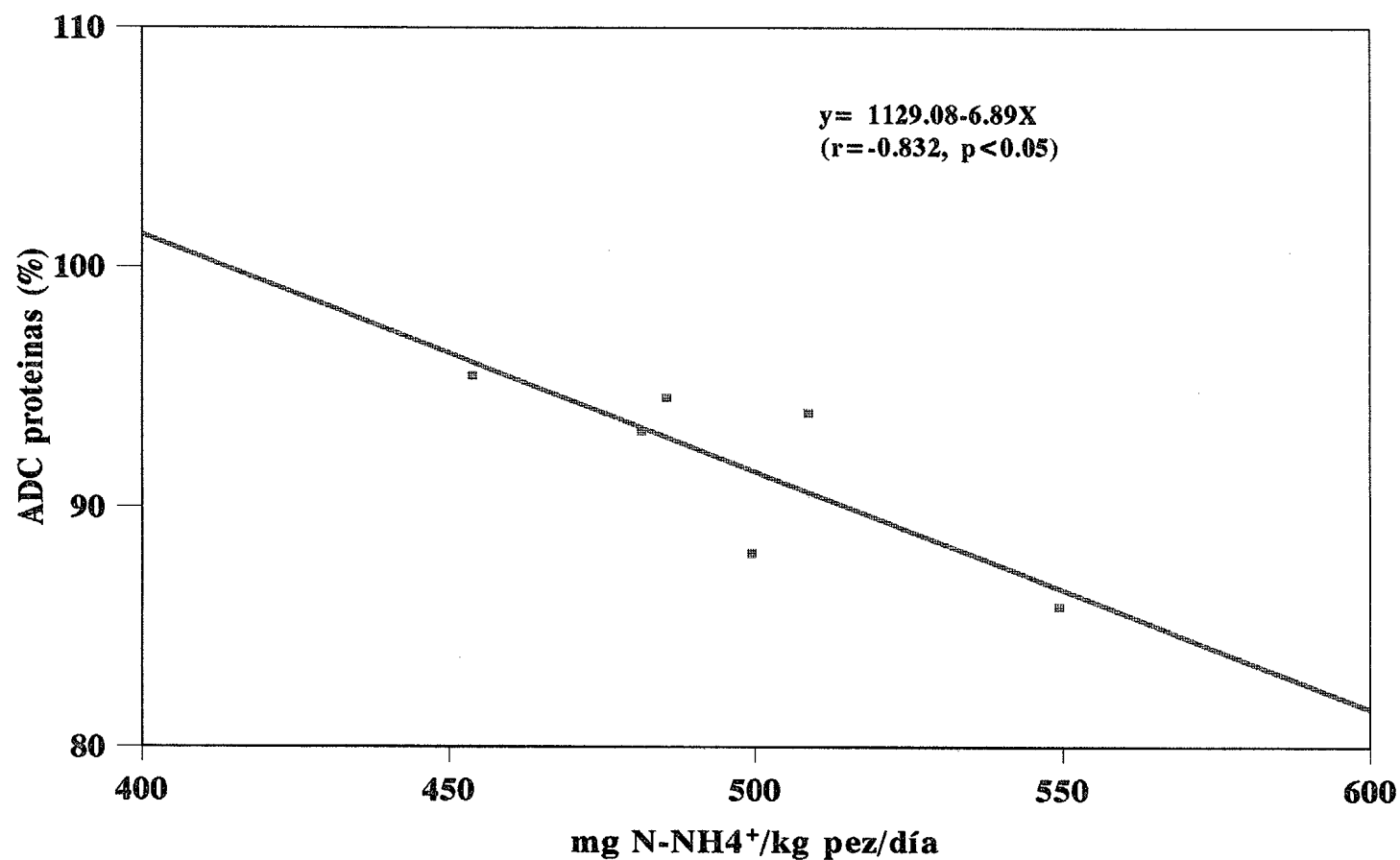
5.2.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Para la realización de este experimento se utilizaron doradas de 72 g de peso medio inicial en grupos de 10 peces por tanque. Los tanques fueron provistos de un flujo continuo (1 l/min) de agua de mar cuya temperatura osciló entre $19 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

La rutina de toma de muestras se llevó a cabo según se indicó en el Apdo. 2.3.3. Las medidas de amonio disuelto se llevaron a cabo en muestras del agua de los tanques después de alimentar a los peces normalmente a primera hora de la mañana con los piensos experimentales que aparecen en la Tabla 9. Se tomaron muestras de agua cada dos horas, durante un período de 8 horas, en dos días consecutivos, las cuales se almacenaron inmediatamente en recipientes oscuros a 4°C , con el fin de analizarlas todas juntas según el método descrito en el apartado 2.7.

Partiendo del hecho de que no se pudieron tomar muestras después de ese período de 8 h, entre otras cosas por la falta de luz en el interior de la nave de cultivo, los valores determinados para esta especie por PORTER et al. (1987), fueron usados como base con la que calcular la excreción total en un período de 24 h, mediante la extrapolación de los valores obtenidos en nuestro experimento.

5.2.2. RESULTADOS.



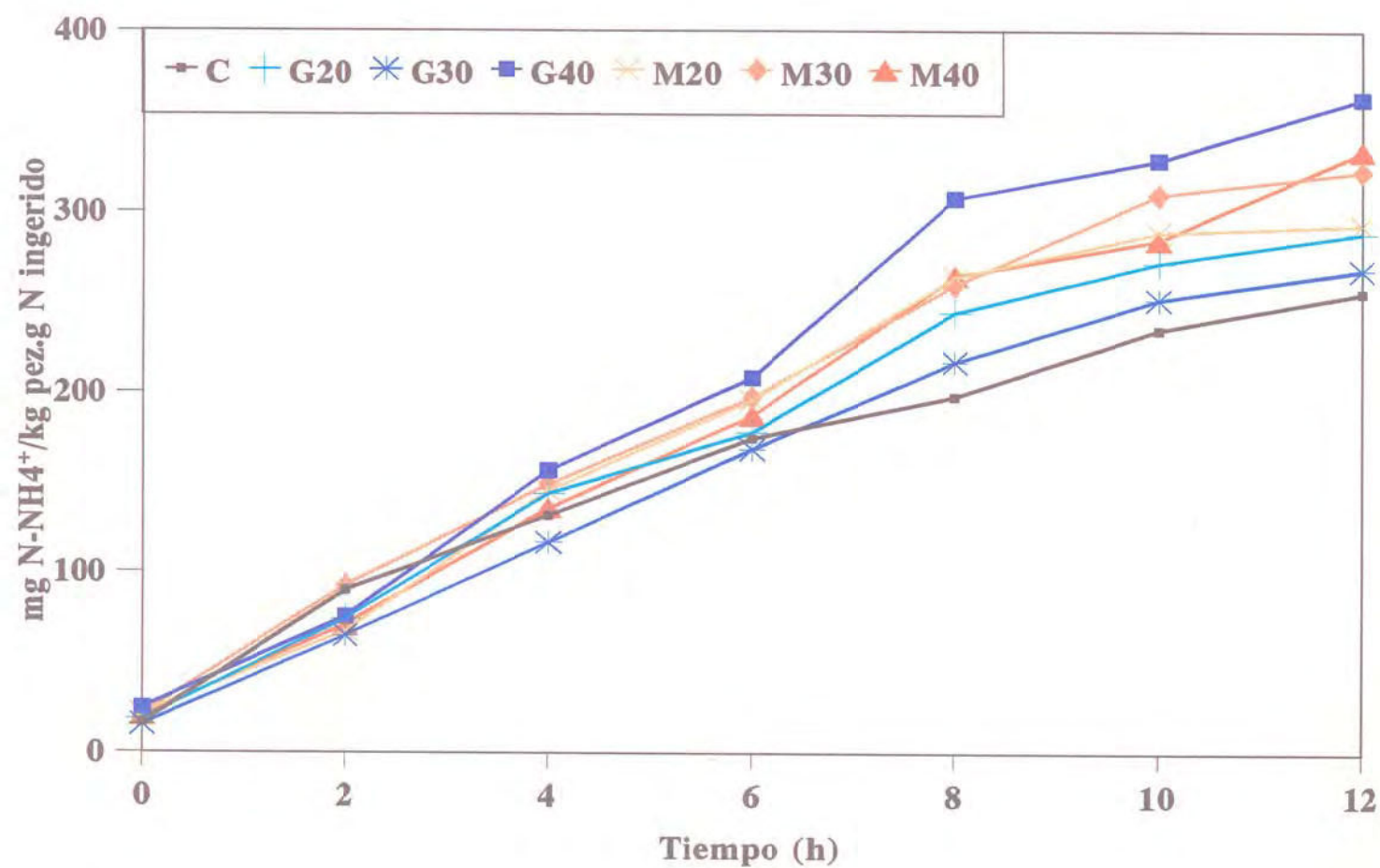


Fig. 31. Excreción acumulada de N-NH₄⁺ de los peces alimentados con las dietas experimentales de gluten y carne.

La Figura 31 muestra la concentración acumulada de N-NH_4^+ alcanzada en los tanques a lo largo de un período de 12 h. Con el fin de comparar los niveles de excreción en peces alimentados con diferente cantidad de proteína, los datos se refirieron a N ingerido en gramos. Las cantidades de N-NH_4^+ en el agua después de este tiempo variaron entre 255 y 363 mg N/kg pez y g N ingerido. Aunque todos los valores de excreción de N-NH_4^+ obtenidos de los peces alimentados con fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado son superiores a las obtenidas con la dieta control, sólo pudieron ser establecidas diferencias significativas cuando se comparó la excreción obtenida por los peces alimentados con los niveles más altos de sustitución de ambas fuentes proteicas (G40 y M40), con respecto del resto de los tratamientos incluido el control (Tabla 42).

Tabla 42. Excreción de nitrógeno soluble por gramo de nitrógeno ingerido por Kg de pez, para los peces alimentados con las dietas experimentales de harinas de gluten de maíz y carne y huesos, a las 12 horas post ingesta.

	C	G20	G30	G40	M20	M30	M40
N soluble/g N ingerido	225±51 ^a	288±26 ^a	268±6 ^a	364±2 ^b	293±8 ^a	306±40 ^a	334±8 ^b

5.3.3. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Comparando los resultados obtenidos por PORTER et al. (1987), quienes trabajaron con la misma talla y especie de peces, se observa que en aquel caso los valores mostrados para la excreción de N-NH_4^+ fueron de 1.5 a 1.8 veces menores a los obtenidos en el presente experimento. Estas diferencias pudieran estar relacionadas con menores niveles de N ingerido, ya que en aquél trabajo no se hace mención alguna acerca de este dato.

Por otro lado, la influencia de la calidad de la proteína sobre los picos de excreción amoniacal resulta evidente a partir de la Fig. 30.

Al igual que en el experimento anterior con harinas de soja y de altramuiz fue obtenido un modelo de "dos picos" para las excreciones de N-NH_4^+ . El primer pico, obtenido 4 horas después de la ingestión del alimento, se correspondería con aquel descrito para otras especies de peces como salmón sockeye (BRETT y ZALA, 1975), trucha arco iris (KAUSHIK y OLIVA TELES, 1985; KAUSHIK, 1990) o dorada (PORTER et al., 1987). Por otro lado, cuando se alimenta a los peces con dos tomas al día diferentes autores, como KAUSHIK (1980) en trucha arco iris y RAMNARINE et al. (1987) en bacalao, han encontrado también el modelo de "dos picos" observado en el presente experimento.

ECHEVARRIA et al. (1993), trabajando con doradas encontraron además que la excreción postprandial era bifásica, con picos a las 2 y a las 6-8 h. En dicha experiencia, los peces sin alimentar durante un período de 24 y 48 h mostraron los picos a las mismas horas pero con una intensidad mucho menor, lo cual según esos autores sugiere la existencia de un ritmo biológico en la excreción de amonio. En este sentido la excreción de amonio en truchas de 100 g fue de $12.4 \mu\text{g/g}$ peso fresco/h a 12°C , densidad de 4 kg/m^3 y alimentación 1.2% con una dieta comercial conteniendo aproximadamente 47% de proteína cruda. Las mismas truchas excretaron $4.6 \mu\text{g/g}$ peso fresco/h de amonio en condiciones de no alimentación (BERGERO et al., 1993).

Alimentar a los peces a la misma hora todos los días puede promover una conducta anticipada en los peces que les hace "prepararse" para recibir el alimento. Esto explicaría el porqué aún en ausencia de alimento, la mayoría de los ritmos digestivos y metabólicos continúan oscilando como en condiciones previas al suministro del alimento. De hecho se observó una mayor ingesta en la segunda toma que en la primera, lo cual podría estar relacionado con la mayor intensidad observada en los segundos picos.

En la Tabla 17 se muestra el perfil teórico de aminoácidos de cada una de las dietas ensayadas en este experimento. En ella se observa que la composición en aminoácidos de las dietas con un 30% de sustitución, tanto para el gluten como para la carne, es intermedia entre las que tienen un 20% y un 40% de sustitución, las cuales muestran niveles comparativamente menores o mayores de algunos aminoácidos esenciales con respecto a las necesidades para esta especie. Todo ello concuerda con la Tabla 19, en la que los valores más altos de excreción se tienen para los niveles de sustitución del 40% para ambos grupos de dietas, y

también con los valores de utilización proteica encontrados en el experimento previo de engorde, en el que los valores mayores observados, aunque sin diferencias significativas con respecto del resto de las dietas dentro del mismo grupo, se obtuvieron para los tratamientos que incluyeron un 30% de sustitución (G30 y M30).

6. CONCLUSIONES GENERALES.

- 1.- Se confirma la pobre disponibilidad de los carbohidratos de la **harina de soja** por la disminución de la digestibilidad de los mismos con el incremento de este ingrediente vegetal en el pienso, provocando una menor deposición de glucógeno a nivel histológico en hígado y una disminución del contenido en lípidos en músculo.
- 2.- Se confirma la baja disponibilidad del fósforo presente en la harina de soja por una reducción de la beta-oxidación de los ácidos grasos y de la gluconeogénesis, que ocasiona la aparición de acúmulos grasos y reducción de la deposición de glucógeno en el tejido hepático a elevados niveles de inclusión de esta harina. Por ello la adición de fósforo inorgánico en la dieta con mayor nivel de sustitución por harina de soja disminuye los acúmulos de grasa en el tejido hepático y reduce el contenido de lípidos en el músculo, por una activación de las rutas de beta-oxidación de los ácidos grasos y gluconeogénesis en dicho tejido.
- 4.- No se observó un efecto significativo de la adición de zinc o fitasas en las dietas con un nivel de sustitución del 30% de la proteína de pescado por proteína de soja.
- 5.- Se demuestra la desfavorable composición de ácidos grasos de la harina de soja en relación con el elevado contenido en ácido linolénico escasamente utilizado por los peces marinos y que contribuiría a la degeneración grasa del hígado. Así la sustitución de los lípidos de la soja por aceite de pescado, pobre en ácido linoléico, corrigió completamente las alteraciones histológicas en el hígado, incrementando la deposición de lípidos en el músculo mediante la estimulación del transporte extrahepático de los lípidos.
- 6.- La evaluación nutritiva demuestra que el nivel máximo de inclusión de harina de soja en piensos para engorde de dorada se sitúa en torno al 20% del peso seco de la fórmula. Niveles superiores determinan la presencia de acúmulos grasos anormales en el hígado de los peces.

- 7.- Las **harinas de altramuz y gluten de maíz** pueden ser utilizadas como ingredientes proteicos en piensos para engorde de dorada a niveles que representan hasta un 30% de la proteína de la fórmula. Si se excede esta proporción, a pesar de mantenerse el crecimiento dentro de valores aceptables, se intensifican los procesos de desaminación indicativos de un peor uso metabólico de la proteína y que determinan una mayor eliminación al medio de N amoniacal.
- 8.- Los contradictorios resultados encontrados en los diferentes ensayos de evaluación nutritiva de la **harina de carne y huesos** ponen de manifiesto que en conjunto se trata de una materia prima de mediana calidad aunque su proteína presenta un excelente perfil aminoacídico. Elevados niveles de esta harina en el pienso produjeron focos necróticos y otras alteraciones hepáticas. Si existen condicionantes favorables a su utilización se recomienda que su nivel en la fórmula no represente más de un 20% de la proteína total.
- 9.- El empleo en los piensos para dorada de algunos de los ingredientes ensayados puede presentar un interés comercial evidente; los aspectos más destacables serían los siguientes:
- La utilización de harina de gluten de maíz determina la aparición de una llamativa coloración amarillo-anaranjada a nivel de opérculos y aletas, rasgo que podría repercutir positivamente en su comercialización.
 - Si se emplean piensos con soja, la adición de P disminuye el contenido graso del músculo en un 25%, en tanto que la adición de ácidos grasos n-3 lo aumenta en un 50%.

7. BIBLIOGRAFIA

ACKMAN, R.G., 1980. En: *Advances in Fish Science and Technology*, J.J. Connell (Ed.). Fishing New Books, Surrey U.K., pp. 86-103.

ADRON, J.W., BLAIR, A., COWEY, C.B. & SHANKS, A.M., 1976. Effects of dietary energy level and dietary energy source on growth, feed conversion and body composition of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquac.*, 7: 125-132.

AKIYAMA, D.M., 1988. Soybean meal utilization in fish feeds. *American Soybean Assiciation*, 1988, 15 pp.

AKIYAMA, D.M., 1991. The use of soy products and other plant protein supplements in aquaculture feeds. *ASA Techn. Bull.*, AQ27, 1991, pp. 1-18.

ALEXIS, M.N., 1990. Comparative evaluation of soybean meal land carob seed germ meal as dietary ingredients for rainbow trout fingerling. *Aquat. Living Resour.*, 3: 235-241.

ALEXIS, M.N., PAPAPARASKEVA, E. & THEOCHARI, V., 1985. Formulation of practical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fish meal by poultry by-products and certain plant by-products. *Aquac.*, 50: 61-73.

ALEXIS, M., FILIOGLOU, M. & THEOCHARI, V., 1988. Apparent digestibility measurements of feedstuffs having potential for use in rainbow trout diets. *Thalassographica* 11(1): 19-26.

ALLIOT, E., PASTOREAUD, A., PELAEZ, J. & MÉTAILLER, R., 1979. Utilisation des farines végétales et des levures cultivées sur alcanes pour l'alimentation du bar (*Dicentrarchus labrax*). *Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Hamburg 20-23 June, 1978. vol. II. pp. 229-238.

AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 1982. *Soya Bluebook*, St. Louis, MO.

AMERIO, M. & GATTI, S., 1983. Sulla grenella integrate di soia trattata con forno a microonde. *Atti. V Congr. Maz. ASPA*. Gargnano del Garda, pp. 39-43.

AMERIO, M., COSTA, M., MAZZOLA, A. & CRISAFI, E., 1989. Use of extracted Soybean meal in diets for sea bass. *Aquaculture a Biotechnology in Progress*. N. de Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors and N. Wilkins (Eds.). European Aquac. Soc., Bredene, Belgium, pp. 603-608.

- ANDERSON, J., CAPPER, B.S. & BROMAGE, N.R., 1991. Measurement and prediction on digestible energy value in feedstuffs for the herbivorous fish Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). *Br. J. Nutr.*, 66: 37-48.
- ANDERSON, S.J., LALL, S.P., ANDERSON, D.M. & CHANDRASOMA, J., 1992. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea water. *Aquac.*, 108: 111-124.
- ANDREWS, J.W. & PAGE, J.W., 1974. Growth factors in the fish meal component of catfish diets. *J. Nutr.* 104: 1091-1096.
- ANDREWS, J.W., PAGE, J.W. & MURRAY, M.W., 1977. Supplementation of semipurified casein diet for catfish with free amino acids and gelatin. *J. Nutr.* 107: 1153-1156.
- AOAC, 1985. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. 14th. Edition. Washington, 1018 pp.
- ARABA, M. & DALE, N.M., 1988. Evaluation of protein solubility as an indicator of under processing of soybean meal. *Poultry Sci.*, 69: 1749-1752.
- ARNESEN, P., BRATTAS, L.E., OLLI, J. & KROGDAHL, A., 1989. Soybean carbohydrates appear to restrict utilization of nutrients by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Proc. Third. Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Toba, Japan. pp. 273-280.
- ATHERTON, W.D. & AITKEN, A., 1970. Growth, nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri* Rich. *Comp. Biochem. Physiol.*, 36: 719-747.
- BARLOW, S., 1989. Fishmeal: World outlook to the year 2000. *Fish Farmer*, Sept./Oct. pp. 40-43.
- BEAMISH, F.W.H. & THOMAS, E., 1984. Effects of dietary protein and lipid on nitrogen losses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquac.*, 41: 359-371.
- BECKER, M. & NEHRING, K., 1965. Handbuch der Futtermittel, vol. II. Paul Parey, Hamburg, 475 pp.
- BELL, M.V., HENDERSON, R.J. & SARGENT, J.R., 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B: 711-719.
- BERGERO, D., FORNERIS, G., MUSSA, P.P., BOCCIGNONE, M., PALMEGIANO, G.B., SARRA, C., ZOCCARATO, I. & BIANCHINI, M.L., 1993. Maize in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeding. Note I: effect of technological treatments on in vivo and in vitro digestibility and on ammonia excretion. *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 202.

- BERG-LEA, T., BRATTAS, L.E. & KROGDAHL, A., 1989. Soybean proteinase inhibitors affects nutrient digestion in rainbow trout. In: J. Huisman, T.F.B. van der Pole and Liener, I.E. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. Pudoc, Wageningen, pp. 99-102.
- BERGNER, H. & KETZ, H.A., 1969. Verdauung, Resorption, Intermediärstoffwechsel bei landwirtschaftlichen Nutztieren. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 1974.
- BERGOT, F. & BRECQUE, J., 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake level. *Aquac.*, 34: 203-212.
- BERGSTROM, E., 1979. Experiments on the use of single cell proteins in Atlantic salmon diets. En *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, editado por J.E. Halver and K. Tiews. H. Heenemann GmbH and Co.Schr. Bundesforschungsanst. Fisch. Hamb., Berlin. vol. II, pp. 105-116.
- BLACKBURN, S., 1976. Enzyme Estructure and Function. Marcel Dekker, INC., N.Y., pp. 105-142.
- BLAZER, V.S., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Rev. of Fish Diseases*, pp. 309-323.
- BONE, Q. & MARSHALL, N.B., 1982. Biology of Fish. Blackie & Son Ltd., Glasgow, 262 pp.
- BRADFORD, M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Ann. Biochem.*, 72: 248-254.
- BRAFIELD, A.E., 1985. Laboratory studies of energy budgets. En: *Fish Energetics New Perspectives*. P. Tytler & P. Calow Eds. Croom Helm, London. pp. 257-307.
- BRETT, J.R. & ZALA, C.A., 1975. Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32: 2479-2486.
- BRODY, S., 1945. Bioenergetics and Growth. Reinhold, New York.
- BROWN, P.B., 1991. Comparison of fecal collection methods for determining phosphorus absorption in rainbow trout. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 443-447. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61).
- BROWN, P.B., STRANGE, R.J. & ROBBINS, K.R., 1985. Protein digestibility coefficients for yearling channel catfish fed high protein feedstuffs, vol. 47, n° 2, pp. 94-97.

- BUDDINGTON, R.K., 1979. Digestion of an aquatic macrophyte by *Tilapia zilli* (Gervais). *Prog. Fish Cult.*, 47: 94-97.
- BUDDINGTON, R.K., 1980. Hydrolysis-resistant organic matter as a reference for measurement of fish digestive efficiency. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109: 653-656.
- BUDDINGTON, R.K. & HILTON, J.W., 1987. Intestinal adaptation of rainbow trout to changes in dietary carbohydrates, *Am. J. Physiol.*, 253: G489-G496.
- CAMPBELL, G.L. & BEDFORD, M.R., 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: a review. *Ann. J. Anim. Sci.*, 72: 449-466.
- CARDENETE, G. & MOYANO, F.J., 1988. El amoníaco en los peces. I. Aspectos metabólicos y excreción. *ARS Pharmaceutica*. Tomo XXIX, nº 2: 163-172.
- CARDENETE, G., MORALES, A.E., DE LA HIGUERA, M. & SANZ, A., 1991. Nutritive evaluation of sunflower meal as protein source for rainbow trout. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 927-931. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, nº 61).
- CARDENETE, G., MORALES, A.E., MOYANO, F.J., SANZ, A. & DE LA HIGUERA, M., 1993. Adición de enzimas exógenas como medio de mejora de la utilización digestiva de las materias primas en dietas para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 211.
- CARNOVALE, E., LUGARO, E. AND LOMBARDI-BOCCIA, G., 1988. Phytic acid in faba bean and pea effect on protein availability. *Cereal Chem.*, 65: 114-117.
- CASTELL, J.D., 1979. Review of lipid requirements of finfish. *Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Hamburg 20-23 June, 1978. vol. I. Berlin 1979, pp. 59-84.
- CASTRO, L. DAVIS, D.A. & ARNOLD, D.C.R., 1993. Evaluation of nutrient digestibility in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 334.
- CAULTON, M.S., 1978. The importance of habitat temperatures for growth in the tropical cichlid *Tilapia rendali* Boulenger. *J. Fish. Biol.*, 13: 99-112.
- COELHO, J.F.S., GOMES, E.S. & PEREIRA, J.O., 1989. Crecimiento comparativo de la trucha arco iris de distintos tamaños alimentadas con pienso que contenía harina de pescado u otras fuentes proteicas. *Avances en Alimentación y Mejora Animal*, vol. 29, nº 2, pp. 60-64.

- COLL MORALES, J., 1986. *Acuicultura Marina Animal* (2ª Edición). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 670 pp.
- COLT, J.E. & ARMSTRONG, D.A., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. Proc. of the Bio-Engineering Symp. for Fish Cultured. L.J. Allen and A.C. Kinney (Eds.). *Am. Fish. Soc.* 1981, pp. 34-47.
- COWEY, C.B., 1975. Aspects of protein utilization by fish. *Proc. Nutr. Soc.*, 34: 57-63.
- COWEY, C.B., 1979. Protein and amino acid requeriments of finfish. En: J.E. Halver & K. Tiews (Eds.). *Finfish Nutrition and Fish Feed Technology*, vol I, Heenemann, Berlin, pp. 3-16.
- COWEY, C.B., 1994. Intermediary metabolism in fish with reference to output of end products of N & P. *II Intern. Symp. on Nutritional Estrategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 1994, Aalborg, Denmark, 24-27.
- COWEY, C.B. & LUQUET, P., 1983. Physiological basis of protein requeriments of fishes. Critical analysis of allowances. In: *Protein Metabolism and Nutrition*. Arnal, M. Pion, R. and Bonin, D. Eds. I, INRA, Paris, 365-384.
- COWEY, C.B. & SARGENT, J.R., 1979. Fish Nutrition. En *Fish Physiology*, editado por W.S. Hoar y D.J. Randall. Nueva York, Academic Press, vol. 8: 1-69.
- COWEY, C.B. & TACON, A.G.J., 1983. In: *Proc. Second Int. Conf. Aquac. Nutr. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Pruder, G.D., Langdon, C.J. and Conklin, D.E. Eds., Louisiana State University, Baton Rouge. pp. 13-30.
- COWEY, C.B. & WALTON, M.J., 1988. Studies on the uptake of ^{14}C amino acids derived from both dietary ^{14}C protein and ^{14}C amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 33: 293-305.
- COWEY, C.B., POPE, J.A., ADRON, J.W. & BLAIR, A., 1971. Studies on the nutrition of marine flatfish. Growth of the fish *Pleuronectes platessa* on diets containig proteins derived from plants and other sources. *Mar. Biol.*, 10: 145-153.
- COWEY, C.B., POPE, J.A. , ADRON, J.W. & BLAIR, A., 1972. Studies on the nutrition of marine flatfish. The protein requeriment of plaice *Pleuronectes platessa*. *Br. J. Nutr.*, 28: 447-456.
- COWEY, C.B., ADRON, J.W., BROWN, D.A. & SHANKS, A.M., 1975. Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice *Pleuronectes platessa* and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice. *Br. J. Nutr.*, 33: 219-231.

- CROMWELL, G.L., 1991. Feeding phytase to increase the availability of phosphorus in feeds for swine. *Proc. 52nd Mn. Nutr. Conf.* pp. 189-200.
- CHAKRABORTY, S.C., 1992. The effect of dietary protein level and ration level on excretion of ammonia in common carp, *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 103A, n° 4, pp. 801-808.
- CHO, C.Y., 1991. Digestibility of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61). pp. 265-274.
- CHO, C.Y. & KAUSHIK, S.J., 1985. Effects of protein intake on metabolizable and net energy value of fish diets. En: *Nutrition and Feeding in Fish*. C.B. Cowey, A.M. Mackie & J.C., Bell (Eds.). Academic Press, London, pp. 95-117.
- CHO, C.Y. & KAUSHIK, S.J., 1990. Nutritional energetics in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 61: 132-172.
- CHO, C.Y. & SLINGER, S.J., 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*. Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology. Ed. por J.E. Halver and K. Tiews. H. Heenenemann. Hamburg, Berlin. vol. 2: 239-247.
- CHO, C.Y., BAYLEY, H.S. & SLINGER, S.J., 1975. An automated fish respirometer for nutrition studies. *Proc. 28th Ann. Meeting of Can. Conf. For Fish Res.*, Vancouver, B.C.
- CHO, C.Y., SLINGER, S.J. & BAYLEY, H.S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake expenditure and productivity. *Comp. Bioch. Physiol.* 73b: 25-41.
- CHO, C.Y., COWEY, C.B. & WATANABE, T., 1985. Methodological approaches to research and development. En: *Finfish Nutrition in Asia*. Methodological approaches to research and development. Ottawa, Ont., IDRC, 1985. pp. 1-80.
- CHUBB, L.G., 1982. Anti-nutritive factors in animal feedstuffs. *Recent Adv. Ani. Nutr.* vol. 38: 21-37.
- DABROWSKA, H. & WOJNO, U., 1977. Studies on the utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of feed mixtures containing soya bean meal and addition of amino acids. *Aquac.* 10: 297-310.
- DABROWSKA, H., GRUDNIEWSKI, C. & DABROWSKI, K., 1979. Artificial diets for common carp: effect of the addition of enzyme extracts. *Prog. Fish Cult.*, 41: 196-200.

- DABROWSKI, K., 1977. Protein requirements of grass carp fry *Ctenopharyngodon idella* Val. *Aquac.*, 12: 63-73.
- DABROWSKI, K., 1979. Energy conversion in carp given feed with different protein contents. *Rocz. Nauk Roln. H.*, 99 (3): 79-89.
- DABROWSKI, K., 1983. Digestion of protein and amino acid absorption in stomachless fish, common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 74A: 409-415.
- DABROWSKI, K. & KOZAK, B., 1979. The use of fish meal and soybean meal as a protein source in the diet of grass carp fry. *Aquac.* 18: 107-114.
- DABROWSKI, K. & KOZLOWSKA, H., 1981. Rapeseed meal in the diet of common carp reared in heated waters. I. Growth of fish and utilization of the diet. En: K. Tiews (Ed.), *Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems*. Heenemann, Hamburg, pp. 263-274.
- DABROWSKI, K., POCZYCZYNSKI, G., KOCK, G. & BERGER, B., 1989. Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization, and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for exocrine pancreatic excretion. *Aquac.*, 77: 29-49.
- DAVIES, S.J., WILLIAMSON, J., ROBINSON, M. & BATESON, I., 1989. Practical inclusion levels of common animal by-products in complete diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peters). *Proc. Third Inter. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish*, Aug. 28-Sep. 1, Toba, Japan, pp. 325-332.
- DAVIES, S.J., MCCONELL, S. & BATESON, R.I., 1990. Potential of rapeseed meal as an alternative protein source in complete diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* P.). *Aquac.*, 87: 145-154.
- DAVIES, S.J., NENGAS, I. & ALEXIS, M., 1991. Partial substitution of fish meal with different meat meal products in diets for sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 907-911. Ed. INRA, (Les Colloques, n° 61).
- DE LA HIGUERA, M., 1989. Use of alternative protein source for the intensive rearing of carnivorous fish: introductory remarks. *Symp. Mediterranean, Aquaculture*, Barcelona, Espagne, Jan. 11-14, 1989, pp. 122-124.
- DE LA HIGUERA, M., GARCÍA-GALLEGO, M., SANZ, A., CARDENETE, G., SUAREZ, M. & MOYANO, F., 1988. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquac.*, 71: 37-50.

- DE LUMEN, B.O., 1990. Molecular approaches to improving the nutritional and functional properties of plant seeds as food sources: developments and comments. *J. Agric. and Food Chem.*, 38, n° 9: 1779-1788.
- DE MÜLDER GROUP, 1988. *Technical Data Report n° 5*. Use of lipromel in practical diets for rainbow trout. Prosper De Mulder Ltd. Doncaster, Yorks, England.
- DE SILVA, S.S. & PERERA, M.K., 1983. Digestibility of an aquatic macrophyte by the cichlid *Etroplus suratensis* (Bloch) with observations on the relative merits of three indigenous components as markers and daily changes in protein digestibility. *J. Fish Biol.*, 23: 675-684.
- DEGODET, D., 1994. Utilization of technologically-treated production of peas in feeds for aquaculture. *II Intern. Symp. on Nutritional Estrategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 24-27, 1994, Aalborg, Denmark.
- DELONG, D.C., HALVER, J.E. & MERTZ, E.T., 1958. Nutrition of salmonid fishes-VI. Protein requeriments of chinook salmon at two water temperatures. *J. Nutr.*, 65: 589-599.
- DELONG, D.C., HALVER, J.E. & MERTZ, E.T., 1959. Nutrition of salmonid fishes. VII. Nitrogen supplements for chinook salmon diets. *J. Nutr.*, 68: 663-669.
- DOLL, H., 1984. Nutritional aspects of cereal proteins and approaches to overcome their defficiencies. *Philos. Trans. R. Soc. London*, B304: 373-380.
- DORSA, W.J., ROBINETTE, H.R., ROBINSON, E.H. & POE, W.E., 1982. Effects of dietary cotton seed meal and gossypol on growth of young channel catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 3: 651-655.
- DURBIN, E.D. & DURBIN, A.G., 1981. Assimilation efficiency and nitrogen excretion of a filter-feeding planktivore, the atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Pisces: Clupeidae). *Fish. Bull.*, 79: 601-616.
- ECHEVARRÍA, G., ZARAUZ, N., LÓPEZ-RUIZ, J. & ZAMORA, S., 1993. Study on nitrogen excretion in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Influence of nutritional state. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 105A, n° 1: 17-19.
- EDIN, H., 1918. Orienterance försök över användbarhten av en p "ledkroppsprincipen" grundad metod att bestämma an foderblandings smältbarhet. Meddelande n:r 165 fran Centralanstalten pa jordbruksomradet, husdjursavdelingen Nr. 25, Sthlm. 22.
- EL-SAYED, A.F.M., 1990. Long-term evaluation of cottonseed meal as a protein sourece for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac.*, 84: 315-320.

- ELLIOT, J.M., 1976a. The energetics of feeding, metabolism and growth of brown trout, *Salmo trutta*, in relation to body weight, water temperature and ration size. *J. Anim. Ecol.*, 45: 923-946.
- ELLIOT, J.M., 1976b. Energy losses in the waste products of brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Anim. Ecol.*, 45: 561-580.
- ENELL, M., 1994. Environmental impact of nutrient load from nordic fish farming. *II Intern. Symp. on Nutritional Estrategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 24-27, 1994, Aalborg, Denmark.
- ERDMAN, J. W. JR & FORBES, M.R., 1981. Effects of soya protein on mineral availability. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58: 489-493.
- EVANS, D.H., 1984. *I Int. Cong. Comp. Physiol. Biochem.*, Abs. B 26. Lieja.
- EVANS, R.J. & BUTTS, H.A., 1951. *J. Food Res.* 16: 415.
- FAO, 1983. Fish Feeds and Feeding in Developing Countries. UNDPL / FAO, ADCP / REP/83/18, 97 pp.
- FAO, 1987. Agriculture: Toward 2000. Ref. C87/27, FAO. Rome.
- FAUCONNEAU, B., 1980. Thèse Doct. Ing. INA Paris. 110 pp.
- FAUCONNEAU, B., 1985. Protein synthesis and protein deposition. En *Nutrition and Feeding in Fish*. Cowey, C.B., Mackie, A.M. and Bell, J.G. Eds. Academic Press Ltd., 1985. pp. 1-45.
- FAUNCONNEAU, B., 1988. Partial substitution of protein by a single amino acid or an organic acid in rainbow trout. *Aquac.*, 70: 97-106.
- FLOS, R., 1992. La acuicultura ¿un sector en crecimiento? ¿un sector en crisis? ¿un sector de riesgo?. En: *La Pesca. El Campo. Revista de Información Agraria*. Serv. Estudios Banco Bilbao Vizcaya (Ed.), 126 (Oct-Dic. 1992): 29-45.
- FOLCH, J., LEES, M. & STANLEY, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226: 479-509.
- FOLKE, C. & KAUTSKY, N., 1992. Aquaculture with its environment: Prospects for sustainability. *Ocean & Coastal Management*, 17: 5-24.
- FORSBERG, J.A. & SUMMERFELT, R.C., 1992. Ammonia excretion by fingerling walleyes fed two formulated diets. *Prog. Fish. Cult.*, 54: 45-48.

- FORSTER, R.P. & GOLDSTEIN, L., 1969. Formation of excretory products. En: W.S. Hoar y D.J. Randall (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 1. Academic Press, NY, pp. 313-350.
- FOWLER, L.G., 1980. Substitution of soybean and cootonsead products for fish meal in diets fed to chinook and coho salmon. *Prog. Fish. Cult.*, 42: 87-91.
- FOWLER, L.G. & BANKS, J.L., 1967. Test of different components in the Abernathy salmon diets. *U.S. Fish. Wildl. Serv.*, Tech. Paper nº 13, 18 pp.
- GARCÍA, M., ZAMORA, S. & LÓPEZ, M.A., 1981. The influence of partial replacement of protein by fat in the diet on protein utilization by the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 68 B: 457-460.
- GARLING, D.L. JR. & WILSON, R.P., 1976. Optimum protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 106: 1368-1375.
- GATLIN, D.M. III. & PHILLIPS, H.F., 1989. Dietary calcium, phytate and zinc interactions in channel catfish. *Aquac.*, 79: 259-266.
- GOMES, E.F. & KAUSHIK, S.J., 1989a. Nutritive value of lupin seed meal (*L. angustifolius*) in rainbow trout diets. *Natl. Cong. Aquaculture, Portugal, Algarve*, Jan. 18-20, 1989.
- GOMES, E.F. & KAUSHIK, S.J., 1989b. Incorporation of lupin seed meal, colzapro or triticale as protein/energy substitutes in rainbow trout diets. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Aug. 28- Sep. 1, Toba, Japan, pp. 315-324.
- GOMES, E.F., REMA, P., GOUVEIA, A. & OLIVA TELES, A., 1994. Replacement of fishmeal by plant proteins in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nitrogen balance. *II Intern. Symp. on Nutritional Strategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 24-27, 1994, Aalborg, Denmark.
- GOUVEIA, A., OLIVA TELES, A., GOMES, E. & REMA, P., 1991. Effect of cooking/expansion of three legume seeds on growth and food utilization by rainbow trout. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 933-938. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, nº 61).
- GRABNER, M. & HOFER, R., 1985. The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under in vitro conditions simulating the alimentary tract of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac.*, 48: 111-122.

- GROPP, J., KOOPS, H., TIEWS, K. & BECK, H., 1979. Replacement of fish meal in trout feeds by other feedstuffs. En: *Advances in Aquaculture*. Papers presented at the FAO Technical Conference on Aquaculture, Kyoto, Japan, 21 May-2 Jun. 1976. T.V.R., Pillay and Wm. A., Dill (Eds.), Fishing News Books, Farnham, England, pp. 596-601.
- GROVE, D. J., LOIZIDES, L.G. & NOTT, J., 1978. Satiation amount, frequency of feeding and gastric emptying rate in *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.*, 12 (5): 507-516.
- HABIB, M.A.B., HASAN, M.R. & AKAND, A.M., 1993. Evaluation of silkworm pupae meal as dietary protein source for *Clarias batrachus* (L.). *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 229.
- HAJEN, W.E., BEAMES, R.M., HIGGS, D.A. & DOSANJH, B.S., 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juveniles chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 2. Measurement of digestibility. *Aquac.*, 112: 333-348.
- HALVER, J.E., 1978. *Fish Feed Technology*. Lectures presented at the FAO / UNDP Training Course in Fish Feed Technology, Held at College of Fisheries, Univ. of Washington, Seattle, Washington, 9 Oct-15 Dec., 1978, 394 pp.
- HALVER, J.E., 1989. *Fish Nutrition*, J.E. Halver (Ed.) Academic Press, Inc. 798 pp.
- HALVER, J.E. & TIEWS, K., 1979. Finfish Nutrition and Fish Feed Technology. *Proc. of the World Symp. on Finfish Nutrition and Fish Feed Technology*. Hamburg, 1978. Ed. by Halver and Tiews. Berlin, 1979, 1203 pp.
- HANLEY, F., 1987. The digestibility of foodstuffs and the effect of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac.*, 66: 163-179.
- HARDING, D.E., ALLEN, O.W. JR. & WILSON, R.P., 1977. Sulfur amino acid requirements of channel catfish: L-methionine and L-cystine. *J. Nutr.*, 107: 2031-2035.
- HARDY, R.W., 1989. Practical feeding-Salmon and Trout. En: *Nutrition and Feeding in Fish*. T. Lovell (Ed.), Van Nostrand Reinhold, A VI, N.Y., pp. 185-203.
- HARDY, R.W. & SHEARER, K.D., 1985. Effect of dietary calcium phosphate and zinc supplementation on whole body concentration on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 42: 181-184.
- HARDY, R.W. & SULLIVAN, C.V., 1983. Canola meal in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) production diets. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 40: 281-286.

- HARDY, R.W., FAIRGRIEVE, W.T. & SCOTT, T.M., 1991. Periodic feeding of low-phosphorus diet and phosphorus retention in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 403-412. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61).
- HARTMAN, G.H., 1979. Removal of phytate from soy protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56: 731-735.
- HASTINGS, W.H., 1966. Feed formulation; physical quality of pelleted feed; digestibility. *U.S. Bur. Sport Fish. Wildl. Res. Publ.*, 39: 137-141.
- HENDRIKS, H.G.C.J.M., VAN DEN INGH, T.S.G.A.M., KROGDAHL, A., OLLI, J. & KONINKX, J.F.J.G., 1990. Binding of soybean agglutinin to small intestinal brush border membranes and brush border membrane enzyme activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquac.*, 91: 163-170.
- HEPHER, B., 1988. Nutrición de peces comerciales en estanques. Limusa Ed., México, 1988. 406 pp.
- HEPHER, B., SANDBANK, E. & SHELEF, G., 1979. Alternative protein source for warm-water fish diets. En: J.E. Halver & K. Tiwes (Eds.), *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, vol. I, pp. 327-341. Berlín: Heenemann Verlagsgesel.
- HERMAN, R.L., 1970. Effects of gossypol on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 2: 293-304.
- HIBIYA, T., 1982. An atlas of fish histology: normal pathological and features. Kodansha, Tokyo, Japan.
- HIDALGO, M.C., 1988. Influencia de la calidad y cantidad de la proteína dietaria sobre el crecimiento y la utilización nutritiva de la dieta en la anguila. Tesis Doctoral. Univ. de Granada.
- HIGGS, D.A., MARKERT, J.R., McQUARRIE, D.W., McBRIDE, J.R., DOSANJH, B.S., NICHOLS, C. & HOSKINS, G., 1979. Development of practical dry diets for coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, using poultry-by-product meal, feather meal, soybean meal and rapeseed meal as major protein sources. En *Finfish nutrition and fishfeed technology*, editado por J.E. Halver and K. Tiwes. H. Heenemann GmbH and Co.Schr. Bundesforschungsanst. Fisch. Hamb., Berlin. vol. II, pp. 191-218.
- HIGGS, A.D., McBRIDE, J.R., MARKERT, J.R., DOSANJ, B.S., PLOTNIKOFF, M.D. & CLARKE, W., 1982. Evaluation of tower and candle rapeseed (canola) meal and bronowski rapeseed concentrate as protein supplements in practical dry diets for juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquac.*, 29: 1-31.

- HILTON, J.W., 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquac.*, 79: 223-244.
- HILTON, J.W. & ATKINSON, J.L., 1982. Responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increase levels of available carbohydrate in practical trout diets. *Br. J. Nutr.*, 47: 597-607.
- HOFER, R. & UDDIN, A.N., 1985. Digestives processes during the development of the roach *Rutilus rutilus* L. *J. Fish Biol.* 26: 683-689.
- HOSSAIN, M.A. & JAUNCEY, K., 1989. Studies on the protein, energy and amino-acid digestibility of fish meal, mustard oilcake, linseed and sesame meal for common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Aquac.*, vol. 83, n° 1-2, pp. 59-72.
- HOSSAIN, M.A. & JAUNCEY, K., 1991. The effect of varying dietary phytic acid, calcium and magnesium levels on the nutrition of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 705-715. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61).
- HOSSAIN, M.A., ISLAM, M.N. & ALIM, M.A., 1991. Evaluation of silkworm pupae meal as dietary protein source for catfish (*Heteropneustes fossilis* Bloch). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 785-791. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61).
- HUGHES, S.G., 1985. Evaluation of glutamic acid and glycine as sources of nonessential amino acids for lake trout (*Salvelinus namaycush*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81: 669-671.
- HUGHES, S.G., 1988. Assessment of lupin flour as a diet ingredient for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Aquac.*, 71: 379-385.
- HUGHES, S.G., 1991. Use of lupin flour as a replacement for full-fat soy in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac.*, 93: 57-62.
- IBÉAS, C., IZQUIERDO, M.S. & LORENZO, A., 1994. Effect of different levels of n-3 HUFA highly insaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquac.* 127: 177-188.
- IEO, 1992. I Jornadas en Ciencias y Tecnologías Marinas. SGPM, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), Madrid, 93 pp.
- INA, K., 1981. Availability of plant protein as dietary protein source for red sea bream, *Chrysophrys major*. *Bull. Jap. Soc. Sci.*, 47 (5): 627-630.

- INABA, D., OGINO, C., TAKAMATZU, C., SUGANO, S. & HATA, H., 1962. Digestibility of dietary components in fishes. I. Digestibility of dietary protein in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 28: 367-371.
- JACKSON, A.J., CAPPER, B.S. & MATTY, A.J., 1982. Evaluation of some plant protein in complete diet for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. *Aquac.*, 27: 97-109.
- JAMES, D., 1992. Seafood technology in the 90s: The needs of developing countries. En: *Seafood Science and Technology*. E. Graham Bligh (Ed.). Fishing News Books. pp. 12-23.
- JAYNES, J., YANG, M., ESPINOZA, M. & DODDS, J., 1986. Plant protein improvement by genetic engineering: use of synthetic genes. *Trends Biotechnol.*, 4: 314-320.
- JEFFCOAT, R., ROBERTS, P.A. & JAMES, A.T., 1979. *Eur J. Biochem.*, 101: 447-453.
- JONGBLOED, A.W. & KEMME, P.A., 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 28: 233-242.
- JULIANO, B.O., 1985. Chemistry and Technology. *Amer. Assoc. of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, pp. 1-16.
- KAKADE, M.L., HOFFA, D.E. & LIENER, I.E., 1973. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J. Nutr.*, 103: 1772-1778.
- KALAGEROPOULOS, N., ALEXIS, M.N. & HENDERSON, R.J., 1991. Effect of dietary lipids on tissue fatty acid composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991, pp. 257-267. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61).
- KALAGEROPOULOS, N., ALEXIS, M.N. & HENDERSON, R.J., 1992. Effects of dietary soybean and cod liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquac.*, 104: 293-308.
- KANAZAWA, A., TESHIMA, S. & ONO, K., 1979. Relationship between essential fatty acids requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 295-298.
- KAUSHIK, S.J., 1980. Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in carp (*Cyprinus carpio* L.) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Reprod. Nutr. Develop.*, 20: 1751-1765.

- KAUSHIK, S.J., 1989. Use of alternate protein sources for intensive rearing of carnivorous fish. In: *Progress in Fish Nutrition*. Shi-Yen Shiau (Ed.). Proceedings of the Fish Nutrition Symp., Keelung, Taiwan, ROC. Sep. 6-7 (1989). Marine Food Science Series n° 9, pp. 183-200.
- KAUSHIK, S.J., 1990. Nutrition et alimentation des poissons et controle des déchets piscicoles. *La Pisciculture française*, n° 101: 14-23
- KAUSHIK, S.J. & COWEY, C.B., 1991. Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*. Ontario, Guelph, pp. 3-21
- KAUSHIK, S.J. & DABROWSKI, K., 1983. Nitrogen and energy utilization in juvenile carp fed casein, amino acids or a protein free diet. *Reprod. Nutr. Develop.*, 23: 223-234.
- KAUSHIK, S.J. & OLIVA TELES, A., 1985. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquac.*, 50: 89-101.
- KAUSHIK, S.J., MEDALE, F., FAUNCONNEAU, B. & BLANC, D., 1989. Effect of digestible carbohydrate on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquac.*, 79: 63-74.
- KETOLA, H.G., 1975a. Mineral nutrition: Effects of phosphorus in trout and salmon feeds on water pollution. In Cowey Bell (Ed.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, L. pp. 466-473.
- KETOLA, H.G., 1975b. Mineral supplementation of diets containing soybean meal as a source of protein for rainbow trout. *Prog. Fish. Cult.*, 37: 73-75.
- KETOLA, H.G., 1975c. Requeriments of Atlantic salmon for dietary phosphorus. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 104: 548-51.
- KETOLA, H.G., 1978. Dietary zinc prevents cataract in trout. *Fed. Proc.*, 37: 584.
- KETOLA, H.G., 1979. Influence of dietary zinc on cataracts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.*, 109: 965-969.
- KETOLA, H.G., 1982. Amino acid nutrition in fishes: requeriment and supplementation of diets. *Comp. Bioch. Physiol.* 73B, pp. 17-24.
- KIM, Y.K., 1974. Determination of true digestibility of dietary protein in carp with chromic oxide containing diet. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40: 651-653.
- KIM, K.I., KAYES, T.B. & AMUNDSON, C.H., 1984. Requeriment for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout. *Fed. Proc.*, 43: 338 (Abstr.).

- KISSIL, G. WM., 1981. Known nutritional requirements of the gilthead bream (*Sparus aurata*) in culture. *European Mariculture Society*, Special Publication, n° 6, 1981, pp. 49-55.
- KISSIL, G.W. & GROPP, J., 1984. Optimal protein-energy ratios in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Proc. 2nd Seminar Aqu. Res. March 5-6. Hanburg. *Publ. Eur. Maricult. Soc.*, pp. 84-91.
- KISSIL, G.W.M. & KOVEN, W.M. 1987. Comparison of test diets for the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bamidgeh*, vol. 39: 84-91.
- KLEKOWSKI, R.Z. & DUNCAN, A., 1975. Physiological approach to ecological energetics. En: *Methods for Ecological Bioenergetics*. IBP Handbook. W. Godzinski, R.Z. Klekowski y A. Duncan Eds. Blackwell Sci. Publ., n° 24, Oxford. pp.227-257.
- KNIGHTS, M., 1985. Energetics and fish farming. En: *Fish Energetics, New Perspectives*. P. Tytler and P. Calow (Eds.). Croom Helm. London and Sydney, pp. 309-340.
- KNOX, D., COWEY, C.B. & ADRON, J.W., 1982. Effects of dietary copper and copper:zinc ratio on rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquac.*, 27: 111-119.
- KORRINGA, P., 1976. Farming the red sea bream (*Chrysophrys major*) in Japan. En: *Farming Marine Fishes and Shrimps*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company. pp. 175-184.
- KOVEN, W.M. & KISSIL, G.W., 1984. Requirement for w-3 polyunsaturated fatty acids in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Proc. 2nd. Seminar German-Israeli Coop. Aqu. Res. March, 5-6. Hanburg. *Publ. Eur. Maricult. Soc.*, pp. 93-97.
- KOVEN, W.M., HENDERSON, R.J. & SARGENT, J.R., 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*). I: Lipid class and fatty acids composition on digesta from different segment of the digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.*, 13 (1): 69-79.
- KROGDHAL, A. 1989. Alternative protein sources from plants containing antinutrients affecting digestion in salmonids. Proc. *Third Int. Symp. of Feeding and Nutr. in Fish*, Aug 28-Sep 1, Toba, Japan. pp. 253-261.
- KROM, M.D. & NEORI, A., 1989. A total nutrient budget for an experimental intensive fishpond with circulatory moving seawater. *Aquac.*, 83: 345-358.
- KÜHNE, H., 1973. Untersuchungen zur verdaulichkeit und verwertung verschiedener futtermischungen beim aal (*Anguilla anguilla*). Diss. Univ. Rostock.
- KUNITZ, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. General properties and isolation. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291-329.

- LALL, S.P., 1979. Minerals in finfish nutrition. Proc. *World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Hamburg 20-23 Jun, 1978. vol. I, Berlin, pp. 85-97.
- LANGAR, H. & METAILLER, R., 1989. Use of some protein from animal origin for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), feeding. In: Billard, R. and De Pawn, N. (Eds.). *European Aquaculture Society* special publication n° 10. Bredene, Belgium, 342 pp.
- LATHIA, D., HOCH, G. & KIEVERNAGEL, Y., 1987. Influence of phytate on in vitro digestibility of casein under physiological conditions. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 37: 229-235.
- LATSCHA, T., 1990. Carotenoids-their Nature and Significance in Animal Feeds. F.Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland.
- LEE, D.J. & PUTMAN, G.B., 1973. The response of rainbow trout to varying P:E ratios in a test diet. *J. Nutr.*, 103: 916-922.
- LEE, P.H., 1987. Carotenoids in cultured channel catfish. Diss.- Abst.- Int.- Pt.- B- Sci.- and - Ang. vol. 48, n° 2, 84 pp. Tesis doctoral, Univ. de Auburn, AL (USA)
- LEE, S.M., KANG, Y.J. & LEE, J.Y., 1991. The effect of soybean meal as a partial replacement for white fish meal in diet for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency*, 45: 247-257.
- LERAY, C., 1971. Experimental approaches to artificial feeding of some sea fish. En: J.L. Gaudet (Ed.), Report of the 1970 Workshop on Fish Feed Technology and Nutrition, *Resour. Bull., Bureau Sport Fish and Wildl.*, 102: 169-171.
- LIEBOWITZ, H.E., 1981. Replacing fish meal with soybean meal in practical catfish diets. Master's Thesis, Auburn Univ., Auburn, AL, USA, 215 pp.
- LIENER, I.E. & KAKADE, M.L., 1980. En: *Toxic Constituent of Plant Foodstuffs*. I.E. Liener Ed. 2nd Ed., Academic Press, N.Y., pp. 7-71.
- LIENER, I.E. & KAKADE, M.L., 1980. Protease inhibitors. In: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Liener, I.E. (Ed.). Academic Press, New York. p. 7-71.
- LIU, K. & MARAKIS, P., 1989. An improved calorimetric method for determinig antitryptic activity in soy bean products. *Amer. Assoc. Cereal Chem., Inc.*, 66 (5): 415-422.
- LÓPEZ BELLIDO, L. & FUENTES GARCÍA, M., 1991. El Altramuz. M:A:P:A:, 110 pp.
- LOVELL, R.T., 1978. Dietary phosphorus requeriments of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 617-21.

- LOVELL, R.T., 1979. Formulating diets for aquaculture species. *Feedstuffs* 51 (28): 29-32.
- LOVELL, R.T., 1988. Use of soybean products in diets for aquaculture species. *J. Aquat. Products*, 2: 27-52.
- LOVELL, R.T., 1989. Canola meal in catfish feeds. *Aquacult.-Mag.*, vol. 15, n° 5: 68-70.
- LUMENTA, C., 1985. Utilization of full-fat soybean in the food of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, R.). *Inst. Nac. de la Recherche Agronom.*; Saint Pee-Sur-Nivelle, France, 58 pp.
- LUQUET, P. & KAUSHIK, S.J., 1978. Progrès récent dans le domaine de l'alimentation protéique des salmonidés: épargne des protéines et matières premières de substitution à la farine de poisson. *La Pisciculture Francaise*, vol. 53/54: 14-17.
- LUQUET, P. & SABAUT, J.J., 1974. Nutrition azotée et croissance chez la daurade et la truite. Actes de Colloques, *Colloques sur L'Aquaculture*, Brest, 1, p.243.
- MAAGE, A., SVEIER, H. & JULSHAMN, K., 1989. A comparison of growth rate and trace element accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry fed four different commercial diets. *Aquac.*, 79: 267-273.
- MAHNKEN, C.V.W., SPINELLI, J. & WAKNITZ, F.W., 1980. Evaluation of an alkane yeast (*Candida sp.*) as a substitute for fish meal in Oregon Moist Pellet: Feeding trials with salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquac.* 20, 41-56.
- MARAIS, J.F.K. & KISSIL, G.W., 1979. The influence of energy level on the feed intake, growth, food conversion and body composition of *Sparus aurata*. *Aquac.*, 17: 203-219.
- MARTINEZ, A., 1986. Advances in the substitution of fish meal and soybean meal by sunflower meal in diets of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, L.). *An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol.* Univ. Nal. Auton. Mexico, 13: 345-352.
- MARTINEZ, A. & SERRA, J.L., 1989. Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B, n° 1: 61-66.
- MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M., 1970. Técnicas de Histología Animal. Ed. Toray-Masson S.A., Barcelona, 350 pp.
- MAYNARD, A.L. & LOUSLI, K.J., 1962. Animal Nutrition. 5th Ed. McGraw-Hill, New York, 613 pp.
- MAZID, M.A., TANAKA, Y., KATAYAMA, T., ASADUR, R., SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O., 1979. Growth response of *Tilapia zillii* fingerlings fed isocaloric diets with variable protein levels. *Aquac.*, 18: 115-122.

- MILLIKIN, M.R., 1982. Qualitative and quantitative requirements of fishes: A review. *Fisheries Bulletin*, 80 (4): 655-686.
- MING, F.W., 1985. Ammonia excretion rate as an index for comparing efficiency of dietary protein utilization among rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of different strains. *Aquac.*, 46: 27-35.
- MITCHELL, A.I., DAWSON, A. & HOULIHAN, D.F., 1991. Trypsin inhibitors in commercial fish food. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, June 24-27, 1991. Ed. INRA, Paris 1993. pp. 219-222. (Les Colloques, n° 61).
- MOHSEN, A.A. & LOVELL, R.T., 1990. Partial substitution of soybean meal with animal protein sources in diets for channel catfish. *Aquac.*, 90: 303-311.
- MORALES, A.E., 1993. Valoración de la utilización nutritiva de materias primas alternativas a la harina de pescado como componentes de dietas comerciales para la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral. Univ. de Granada, 1993.
- MORALES, A.E., CARDENETE, G., DE LA HIGUERA, M. & SANZ, A., 1993. Utilización de la energía metabolizable de diferentes dietas, fabricadas con harina de girasol y gluten de maíz sustituyendo parcial y totalmente a la harina de pescado por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p.245.
- MORROW, J.B., 1992. A changing industry: from internal evolution to external responsiveness. En: *Seafood Science and Technology*. E. Graham Bligh (Ed.). Fishing News Books. pp. 1-11.
- MOSCONI-BAC, N., 1987. Hepatic disturbances induced by an artificial feed in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first year of life. *Aquac.*, 67: 93-99.
- MOSCONI-BAC, N., 1990. Reversibility of artificial feed-induced hepatocyte disturbances in cultured juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural study. *Aquac.*, 88: 363-370.
- MOYANO, F.J., 1990. Utilización nutritiva de fuentes proteicas vegetales por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral, Univ. de Granada. 236 pp.
- MOYANO, F.J., CARDENETE, G., SANZ, A. & DE LA HIGUERA, M., 1989. Use of several alternative protein sources in rainbow trout feeding; a general overview. In: Billard, R. and De Pawn, N. (Eds.). *European Aquaculture Society special publication n° 10*, 1989. Bredene, Belgium, 342 pp.

- MOYANO, F.J., CARDENETE, G. & DE LA HIGUERA, M., 1992. Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable proteins for trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Living Resour.*, 5: 23-29.
- MUNILLA-MORAN, R., STARK, J.R. & BARBOUR, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion of cultured turbot larvae *Scophthalmus maximus*. *Aquac.*, 88, 337-350.
- MURAI, T., 1992. Protein nutrition of rainbow trout. *Aquac.*, 100: 191-207.
- MURAI, T., OGATA, H. & NOSE, T., 1982. Methionine coated with various materials supplemented to soybean meal diet for fingerling carp *Cyprinus carpio* and channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48: 85-88.
- MURAI, T., OGATA, H., HIRASAWA, Y., AKIYAMA, T. & NOSE, T., 1987. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1847-1859.
- MURAI, T., OGATA, H., VILLEDA, A. & WATANABE, T., 1989. Utilization of soy flour by fingerling rainbow trout having different body size. *Nippon Suissan Gakkashi*, 55 (6): 1067-1073.
- MURAKAMI, Y., 1967. Studies on cranial deformity in hatchery reared young carp. *Fish Pathology*, 2 (1): 1-10.
- NAKASHIMA, B.S. & LEGGETT, W.C., 1980. Natural sources and requirements of phosphorus for fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37 (4): 679-86.
- NELSON, T.S. & KIRBY, L.K., 1987. The calcium binding properties of natural phytate in chick diets. *Nutr. Rep. Int.*, 35: 949-955.
- NELSON, G.J. & SHORE, V.G., 1974. *J. Biol. Chem.*, 249: 536-542.
- NEW, M.B., 1986. Aquaculture diets of postlarval marine fish of the superfamily *Percoidae*, with special reference to sea bass, sea breams, groupers and yellowtail: a review. *Kuwait Bull. Mar. Sci.*, 7: 75-148.
- NIELSEN, N.C., 1984. The chemistry of legume storage proteins. *Philos. Trans. R. Soc.*, London, B304: 287-296.
- NIELSEN, N.C., 1985. Structure of soy proteins. En: *New Protein Foods*. Altschul, A.M. and Wilcke H.L. (Eds.). Academic Press, INC, vol. 5, 471 pp. 27-64.
- NIIMI, A.J. & BEAMISH, F.W.H., 1974. Bioenergetics and growth of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in relation to body weight and temperature. *Can. J. Zool.*, 52: 447-456.

- NILSSON, A. & FÄNGE, R., 1969. Digestive proteases in the holocephalian fish, *Chimaera monstrosa* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 31: 147-165.
- NOSE, T., 1960. On the digestion of food protein by goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab. Tokyo*, 10: 11-22.
- NOSE, T., 1967. On the metabolic fecal N in young rainbow trout. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.* 17: 97-106.
- NOSE, T., 1971. Effects of amino acids supplemented to petroleum yeast on growth of rainbow trout fingerling. I. A preliminary experiment. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab. Tokyo*, 21:57-63.
- NOSE, T. & ARAI, S., 1972. Optimum level of protein in purified diet for eel, *Anguilla japonica*. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 22: 145-155.
- NOSE, T. & ARAI, S., 1979. Recent avances in studies on mineral nutrition of fish in Japan. En *Advances in Aquaculture*, editado por T.V.R. Pillay y W.A. Dill. Farnham, Surrey, Fishing News Books, Ltd., para la FAO, pp 584-9.
- NOSE, T. & MAMIYA, H., 1963. Protein digestibility of flatfish meal in rainbow trout. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 12 (2): 1-4.
- NOSE, T., LEE, D. & HASHIMOTO, Y., 1974. A note on amino acids esential for growth on young carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40: 903-908.
- N.R.C., 1977. Nutrient Requeriment of Warmwater Fishes. Washington, D.C.: National Academy of Science, 57 pp.
- N.R.C., 1983. Nutrient Requeriments of Colwater Fishes and Shellfishes. National Academy Press. Washington, 63 pp.
- O'DELL, B.L. & DE BOLAND, 1976. Complexation of phytate with proteins and cations in corn, germ and oilseed. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 804-808.
- OGATA, H., ARAI, S. & NOSE, T., 1983. Growth responses of cherry salmon *Oncorhynchus masou* and amago salmon *O. rhodrus* fry fed purified casein diets supplemented with aminoacids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 49: 1381-1385.
- OGINO, C. & CHEN, M.S., 1973a. Protein nutrition in fish. IV. Biological value of dietary proteins in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39: 797-800.
- OGINO, C. & CHEN, M S., 1973b. Protein nutrition in fish. IV. Relation between biological value of dietary proteins and their utilization in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39: 955-959.

- OGINO, C. & SAITO, K., 1970. Protein nutrition in fish-I. The utilization of dietary protein by young carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 36: 250-254.
- OGINO, C. & TAKEDA, H., 1976. Mineral requeriment in fish- III. Calcium and phosphorus requeriment in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 42 (7): 793-799.
- OGINO, C. & TAKEDA, H., 1978. Requeriment in rainbow trout for dietary calcium and phosphorus. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 44 (9): 1019-1022.
- OGINO, C. & YANG, G.Y., 1978. Requeriment of rainbow trout for dietary zinc. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 67: 572-577.
- OGINO, C., CHIOU, J.Y. & TAKEUCHI, T., 1976. Protein nutrition in fish.-VI. Effects of dietary energy sources on the utilization of proteins by rainbow trout and carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 42: 213-218.
- OGINO, C., TAKEUCHI, L., TAKEDA, H. & WATANABE, T., 1979. Availability of dietary phosphorus in carp and rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 45 (12): 1527-1532.
- OLVERA-NOVOA, M.A., CAMPOS, S., SABIDO, G. & MARTÍNEZ PALACIOS, M., 1990. The use of alfalfa leaf protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquac.*, 90: 291-302.
- OLLI, J., KROGDAHL, A. & BERG-LEA, T., 1989. Effects of soybean trypsin inhibitor activity on nutrient digestibility in salmonids fed practical diets containing various soybean meals. *Proc. Third. Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish.*, Toba, Japan. pp. 263-271.
- ONISHI, T., SUZUKI, M. & TAKEUCHI, M., 1981. Change in carp hepatopancreatic enzyme activities with dietary phosphorus levels. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 47: 553-557.
- ORACHUNWONG, C., KUGLER, J., PEQUIGNOT, J. & BHUKASWAN, T., 1988. Growth and histological studies on the liver and anterior intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on mixed foods: *Daphnia magna*, *Chlorella vulgaris* and commercial carp pellets. *2nd Int. Symp. on Tilapia in Aquaculture*, Bangkok (Thailand), 16-20 Mar, 1987. Pullin, R.S.V., Tonguthai, K., Maclean, J.L. (Eds.), n° 15, pp. 361-365.
- OSBORNE, T.B., MENDEL, L.B. & FERRY, E.L., 1919. A method for expressing numerically the growth promoting values of protein. *J. Biol. Chem.*, 37: 223-229.
- OWEN, J.M., ADRON, J. W., MIDDELETON, C. & COWEY, C.B., 1975. *Lipids*, 10: 528-531.
- PAGE, J.W. & ANDREWS, J.W., 1973. Interactions of dietary levels of protein and energy on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 103: 1339.

- PANDIAN, T.J. & VIVEKANANDAN, E., 1985. Energetics of feeding and digestion. En: P. Tyler y P. Calow (Eds.). *Fish Energetics: New Perspectives*. Crom Helm, London, pp. 99-124.
- PAULSON, L.J., 1980. Models of ammonia excretion for brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1421-1425.
- PEREIRA, P.G., RAMOS, M.A. & CARVALHO, M.M., 1987. Food conversion and growth of *Sparus aurata* L. under artificial diets. *Publ. Avuls. Inst. Nac. Invest. Pescas (Porto)*, 12: 127-138.
- PERRIER, H., PERRIER, C., PERES, G. & GRAS, J., 1979. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B: 245-248.
- PFEFFER, E. & BECKMANN, J., 1991. Hydrothermally treated soy beans as source of dietary protein for rainbow trout (*Salmo gairdneri*, R.). *Arch. Anim. Nutr.*, Berlin, 41 (2): 223-228.
- PHILLIPS, A.M., 1969. Nutrition, digestion and energy utilization. En: *Fish Physiology*. Vol. I. W.S. Hoar and D.J. Randall (Eds.). Academic Press, New York and London, pp. 391-432.
- PIMENTEL-RODRIGUEZ, A.M., 1994. A biological (nutritional) approach to the environmental impact of trout culture in Portugal. *II Intern. Symp. on Nutritional Estrategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 24-27, 1994, Aalborg, Denmark.
- PLAKAS, S.M., LEE, T.C., WOLKE, R. & MEADE, T.R., 1985. Effect of Maillard Browning reaction on protein utilization and plasma amino acid response by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.*, 115: 1585-1599.
- PODOLIAK, A.H., 1961. Relation between water temperature and metabolism of dietary phosphorus by fingerling brook trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 90: 398-403.
- PODOLIAK, A.H., & McCORMICK, J.H., 1967. Distribution of dietary phosphate to the acid soluble fraction of the muscle and viscera of brook trout. *Fish. Res. Bull.* 30: 14-24.
- PONGMANEERAT, J. & WATANABE, T., 1991. Nutritive value of protein of feed ingredients for carp, *Ciprymus carpio*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 503-510.
- PONGMANEERAT, J. & WATANABE, T., 1992. Utilization of soybean meal as protein source in diets for rainbow trout. *Nippon Suissan Gakkaishi*, vol. 58, nº 10, pp. 1983-1990.
- PORTER, C. KROM, M.D. & GORDIN, H., 1986. Effect of water quality on the growth rate of *Sparus aurata* in marine fishponds. *Aquac.*, 59: 299-315.

- PORTER, C., KROM, M.D., ROBBINS, M.G., BRICKNELL, L. & DAVIDSON, A., 1987. Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. *Aquac.* 66: 287-298.
- RAMNARINE I.W., PIRIET, J.M., JOHNSTONE, A.D.F. & SMITH, G., 1987. The influence of ration size and feeding frequency on ammonia excretion by juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.*, 31: 545-559.
- REED, G., 1975. Enzyme in Food Processing. G. Reed (Ed.). Academic Press, INC, 573 pp.
- REINITZ, G., 1980. Soybean meal as a substitute for herring meal in practical diets for rainbow trout. *Prog. Fish Cult.*, 42: 103-196.
- REINITZ, G., 1983. Supplementation of rainbow trout starter diets with proteolytic enzyme formulas. *Feedstuff* 21, Nov. 1983.
- REINITZ, G.L., ORME, L.E. & HITZEL, F.N., 1978a. Phosphorus requirement for rainbow trout. *Feedstuffs*, 50: 45.
- REINITZ, G.L., ORME, L.E., LEMM, C.A. & HITZEL, F.N., 1978b. Full-fat soybean meal in rainbow trout diets. *Feedstuffs*, 50: 24-34.
- RHODES, R.J., 1993. Aquaculture situation and outlook, 1993: An overview. *Aquaculture Magazine*, May-June 1993, vol 19, n° 3, pp. 50-59.
- RICHARDSON, N.L., HIGGS, D.A., BEAMES, R.M. & McBRIDE, J., 1985. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Nutr.* 115: 553-567.
- RICHE, M. & BROWN, P.B., 1993. Determination of phosphorus absorption coefficients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed commercially used protein sources. *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 258.
- ROBERTS, R.J., 1981. Patología de los peces. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 366 pp.
- ROBINSON, E.H., WILSON, R.P. & POE, W.E., 1980. Reevaluation of the lysine requirement and lysine utilization by fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 110: 46-52.
- RODEHUTSCORD, M. & PFEFFER, E., 1994. The effect of supplemental microbial phytase on P digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *II Intern. Symp. on Nutritional Strategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 24-27, 1994, Aalborg, Denmark.

- ROSELUND, G., 1986. Comparisons between unconventional proteins and fish meal as a dietary nitrogen source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effects on in vitro muscle protein synthesis. *Fish. Dir. Skr. Ser. Ernering*, 2: 193-200.
- RUMSEY, G.L. & KETOLA, H.G., 1975. Amino acid supplementation of casein in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry and of soybean meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32: 422-426.
- RYCHLY, J., 1980. Nitrogen balance in trout.II. Nitrogen excretion and retention after feeding diets with varying protein and carbohydrate levels. *Aquac.*, 20: 343-350.
- RYCHLY, J. & SPANNHOF, L., 1979. Nitrogen balance in trout. I. Digestibility of diets containing varying levels of protein and carbohydrate. *Aquac.*, 16: 39-46.
- SABAUT, J.J. & LUQUET, P., 1973. Nutritional requeriments of the gilthead bream *Chrysophrys aurata*.
- SAINI, H.S., 1988. Extractability and evaluation of alfa-galactósidos de sucrosa en semillas de leguminosas. *Food Chem.*, 28: 149-157.
- SAINI, H.S., 1989. Thermal stability of protease inhibitors in some cereals and legumes. *Food Chem.*, 32: 59-67.
- SAKAMOTO, S., 1981. Requeriments and defficiency symptoms of dietary minerals in red sea bream. *Report of Fish. Res. Lab., Kyushu Univ.*, nº 5, pp. 1-99.
- SAKAMOTO, S. & YONE, Y., 1973. Effect of dietary calcium/phosphorus ratio upon growth, feed efficiency and blood serum Ca and P level in red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 39: 343-348.
- SAKAMOTO, S. & YONE, Y., 1978. Effect of dietary phosphorus level on chemical composition of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 44: 227-229.
- SAKAMOTO, S. & YONE, Y., 1979a. Requeriment of red sea bream for dietary Mg. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 45: 57-60.
- SAKAMOTO, S. & YONE, Y., 1980. A principal source of deposited lipid in phosphorus deficient red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 46: 1227-30.
- SANCHEZ MUNIZ, F.J., HIGUERA, M., MATAIX, F.J. & VARELA, G., 1978. *Proc. Nutr. Soc.* 37, 81A.
- SANDHOLM, M., SMITH, R.R., SHIH, J.C.H. & SCOTT, M.T., 1976. Determination of antitrypsin factor on agar plates: relationship between antitrypsin and biological value of soybean for trout. *J. Nutr.* 106: 761-766.

- SARGENT, J., HENDERSON, R.J. & TOCHER, D.R., 1989. The lipids. En: *Fish Nutrition*. J.E. Halver (Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 154-218.
- SATIA, B.P., 1974. Quantitative protein requeriments of rainbow trout. *Prog. Fish Cult.*, 33: 132-134.
- SCERBINA, M.A., 1973. Perevarimost i effektivnost ispol'zovanija pitatel'nyh vescestv isjusstvennyh kormov u karpa. *Piscevaja proyslennost*, Moskau.
- SCOTT, M.L., NESHEIM, M.C. & YOUNG, R.J., 1982. Feedstuffs for poultry, In: M.L. Scott, M.C. Nesheim and R.J. Young (Eds.) *Nutrition of the Chicken*. M.L. Scott and Associates, Ithaca, NY, pp. 431-549.
- SCHÄFER, A., KOPPE, W.M., MEYER-BURGDORFF, K.-H. & GÜNTHER, K.D., 1994. Effects of microbial phytase on the utilization of native phosphorus in a soybean meal based diet in carp. Abstract. *II Intern. Symp. on Nutritional Estrategies & Management of Aquaculture Waste*. April, 24-27, 1994, Aalborg, Denmark.
- SEGNER, H. & JUARIO, J.V., 1986. Histological observations on the rearing of milkfish, *Chanos chanos*, fry using different diets. *J. of Applied Ichthyology*, 4: 162-173.
- SENERICHES, M.L. & CHIU, Y.N., 1988. Effect of fish meal on the growth, survival and feed efficiency of milkfish (*Chanos chanos*) fry. *Aquac.*, 71: 61-69.
- SHEARER, K.D. 1984. Changes in the elemental composition of hatchery-reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* associated with growth and reproducction. *Can. J. Fish. of Aquatic Science*, 41: 1592-1600.
- SHEARER, K.D. & HARDY, R.W., 1987. Phosphorus deficiency in rainbow trout fed a diet containing deboned fillet scrap. *Prog. Fish Cult.*, 49: 192-197.
- SHIAU, S.-Y., HUANG, S.-L., 1989. Optimal dietary protein level for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared in seawater. *Aquac.*, 81: 119-127.
- SHIMENO, S., HOSOKAWA, H., KUMON, M., MASUMOTO, T. & UKAWA, M., 1992. Inclusion of defatted soybean meal in diet for fingerling yellowtail. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 58 (7): 1319-1325.
- SHIMENO, S., KUMON, M., ANDO, H. & UKAWA, M., 1993. The growth performance and body composition of young yellowtail fed with diets containing deffated soybean meal for a long period. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 59 (5): 821-825.

- SIMONS, P.C.M., VERSTEEGH, H.A.J., JONGBLOED, A.W., KEMME, P.A., SLUMP, P. BOS, K.D., WOLSTERS, M.G.E., BEUDEKER, R.F. & VERSCHOOR, G.J., 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.*, 66: 525-540.
- SMITH, B.W. & LOVELL, R.T., 1973. Determination of apparent protein digestibility in feeds for channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 102 (4): 831-835.
- SMITH, C., MEGEN, W. VAU, TWAALFHOVEN, L. & HITCHCOCK, C., 1980. The determination of trypsin inhibitors levels in feedstuffs. *J. Sci. Food Agri.*, 31: 341-350.
- SMITH, M.A.K., 1981. Estimation of growth potential by measurement of tissue protein synthetic rates in feeding and fasting rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 19: 213-220.
- SMITH, R.R., 1971. A method for measuring digestibility and metabolizable energy of fish feeds. *Prog. Fish Cult.*, 33: 132-134.
- SOLOMON, D.J. & BRAFIELD, A.E., 1972. The energetics of feeding, metabolism and growth of perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Anim. Ecol.*, 41: 699-718.
- SPINELLI, J., 1980. Unconventional feed ingredients for fish feed. En: *Fish Feed Technology*. Rome, UNDP/FAO, ADCP/REP/80/11: 187-214.
- SPINELLI, J., MAHNKEN, C. & STEINBERG, M., 1979. Alternate sources of protein for fish meal in salmonid diets. En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology. Proc. World Symp. on Finfish Nutr. and Fish Feed Tech.* Ed. by Halver, J.E. and Tiews, K. Hamburg, 1978. vol. II. Berlin, 1979, pp. 131-142.
- SPINELLI, J., HOULE, C.R. & WEKELL, J.C., 1983. The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containig varying quantities of calcium and magnesium. *Aquac.*, 30: 71-83.
- STEFFENS, W., 1981. Protein utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*): A brief review. *Aquac.*, 23: 337-345.
- STEFFENS, W., 1987. Principios Fundamentales de la Alimentación de los Peces. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España, 1987. 275 pp.
- STEPHANIS, J. & DIVANACH, P., 1993. Farming of mediterranean finfish species. Present status and potentials. *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, pp. 290-291.

STORCH, V. & JUARIO, J.V., 1983. The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *J. Fish. Biol.*, 23: 95-103.

SWEETMAN, J.W., 1993. Perspectives and critical success factors in the present farming of fish. *Abstract of the World Aquaculture'93*. Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 288.

TACON, A.G.J., 1979. The use of activated sludge-single cell protein (ASCP), derived from the treatment of domestic sewage in trout diets. En *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, editado por J.E. Halver and K. Tiews. H. Heenemann GmbH and Co.Schr. Bundesforschungsanst. Fisch. Hamb., Berlin. vol. II, pp. 249-267.

TACON, A.G.J., 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. *The Progressive Fish-Culturist*, 43 (4): 205-208.

TACON, A.G.J. & COOKE, D.J., 1980. *Nutr. Rep. Int.* 22, 631-640.

TACON, A.G.J. & COWEY, C.B., 1985. Protein and amino acid requirements. En: P. Tytler and P. Calow (Eds.), *Fish Energetics: New Perspectives*. Croom Helm, London, pp. 155-183

TACON, A.G.J. & JACKSON, A.J., 1985. Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feed. A review. En *Nutrition and Feeding in Fish*. Cowey, C.B., Mackie, A.M. and Bell, J.G. Eds. Academic Press, London, pp. 118-145.

TACON, A.G.J. & RODRIGUEZ, A.M.P., 1984. Comparison of chromic oxide, crude fiber polyethylene and acid-insoluble ash as dietary markers for the estimation of apparent digestibility coefficient in rainbow trout. *Aquac.*, 43: 391-399.

TACON, A.G.J., JAUNCEY, K., FALAYE, A., PANTHA, M., MCGOWAN, I. & STAFFORD, E.A., 1984. The use of meat and bone meal, hidrolized feather meal and soybean meal in practical fry and fingerling diets for *Oreochromis niloticus*. En: *Proceeding of First Int. Symp. on Tilapia Aquac.* (L. Fishelson and Z. Yaron Eds.) pp. 356-365. Tel Aviv Univ. Press, Israel.

TAKAMATSU, C., ENDOH, E., HASEGAWA, T. & SUZUKI, T., 1975. Effect of phosphate supplemented diet on growth of carp. *Suisanzoshoku*, 23: 55-60.

TAKEUCHI, L, TAKEDA, H. & WATANABE, T., 1979. Availability of dietary phosphorus in carp and rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 45: 1527-1532.

TAKEUCHI, M. & NAKAZOE, J., 1981. Effects of dietary phosphorus on lipid content and its composition in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 47: 347-52.

- TAKII, K., SHIMENO, S., NAKAMURA, Y., ITOH, A., OBATAKE, A., KUMAI, H. & TAKEDA, M., 1989. Evaluation of soy protein concentrate as a partial substitute for fish meal protein in practical diet for yellowtail. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Aug 28-Sep 1, Toba, Japan, pp. 281-288.
- THURSTON, R.V., CHAKOUMAKOS, C. & RUSSO, R.C., 1981. Effects of fluctuating exposures on the acute toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cutthroat trout (*S. clarki*). *Water-Res.* vol. 15 n° 7, pp. 911-917.
- TIEWS, K., KOOPS, H., GROPP, J. & BECK, H., 1979. Compilation of fish meal-free diets obtained in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) feeding expts. *Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Finfish Technology*, Hamburg, 20-22 June, 1978. vol. II, Berlin 1979., pp. 219-228.
- TOMIYAMA, T., KOBAYASHI, K. & ISHIO, S., 1956. *Res. Eff. Inf. Nucl. Atom. Bomb Exp. Tokyo*, 1201-1203.
- TROWELL, H., SOUTHGATE, D.A.T., WOLERER, T.M.S., LEEDS, A.R., GASSULL, M.A., JENKINS, D.A., 1976. Dietary fiber redefined. *Lancet I.* p. 967.
- UNDERWOOD, E.J., 1977. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, NY, 545 pp.
- UYIS, W., HETCH, T. & WALTERS, M., 1987. Changes in digestive enzyme activities of *Clarias gariepinus* (Pisces: Claridae) after feeding. *Aquac.*, 63: 243-250.
- VAN DEN INGH, T.S.G.A.M., KROGDAHL, A., OLLI, J.J., HENDRIKS, H.G.C.J.M. & KONINKX, J.G.J.F., 1991 Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquac.*, 94: 297-305.
- VAN WAARDE, A., 1983. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74 B, n° 4: 675-684.
- VARNIHS, S.A. & CARPENTER, K.J., 1975. *Br. J. Nutr.*, 37: 339-349.
- VERGARA, J.M., 1992. Studies on the utilization of dietary protein and energy by gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Ph. D. Thesis. Univ. Stirling, 162 pp.
- VIOLA, S. & ARIELI, Y., 1983. Nutrition studies with tilapia (*Sarotherodon*). 1. Replacement of fish meal by soybean meal in feeds for intensive tilapia culture. *Bamidgeh*, 35 (1): 9-17.
- VIOLA, S. MOKADY, S., RAPPAPORT, U. & ARIELI, Y., 1982. Partial and complete replacement of fish meal by soybean meal in feeds for intensive culture of carp. *Aquac.*, 26: 223-236.

- VIOLA, S., MOKADY, S. & ARIELI, Y., 1983. Effects of soybean processing methods on the growth of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac.*, 32: 27-38.
- VIOLA, S., ARIELI, Y. & ZOHAR, G., 1988. Animal-protein-free feeds for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) in intensive culture. *Aquac.*, 75: 115-125.
- VIOLA, S., ARIELI, Y. & ZOHAR, G., 1989. Unusual feedstuffs (tapioca and lupin) as ingredient for carp and tilapia feeds in intensive aquaculture. *J. Aquacul. Bamidgh.*, 40: 29-34.
- VIYAKARN, V., WATANABE, T., AOKI, H., TSUDA, H., SAKAMOTO, H., OKAMOTO, N., ISO, N., SATOH, S. & TAKEUCHI, T., 1992. Use of soybean meal as a substitute for fish meal in a newly developed soft-dry pellet for yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58 (10): 1991-2000.
- VOHRA, P. & KRATZER, F.H., 1991. Evaluation of soybean meal determines adequacy of heat treatment. *Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*, Thailand, Indonesia, Sep. 19-25, 1991, pp. 226-241. *Feedstuffs*, vol. 63 (8), Febr. 25.
- WALTON, M.J., 1987. En: *Nutrición en Acuicultura*. vol. I. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta Eds. CAICYT. Madrid, pp. 225-303.
- WATANABE, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B (1): 3-15.
- WATANABE, T., 1988. Fish Nutrition and Mariculture. Jica Textbook. The General Aquaculture Course. Kanagagua International Fisheries Training Center. Japan International Cooperation Agency. Japan, 1988, 233 pp.
- WATANABE, T. & PONGMANEERAT, J., 1991. Quality evaluation of some animal protein sources for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Nippon. Suisan Gakkaishi*, 57: 495-501.
- WATANABE, T., MURAKAMI, A., TAKEUCHI, L., NOSE, T. & OGINO, C., 1980a. Requirement of chum salmon held in freshwater for dietary phosphorus. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 46 (3): 361-367.
- WATANABE, T., TAKEUCHI, T. & OGINO, C., 1980b. Effect on rainbow trout and chum salmon of deletion of trace elements from fish meal diets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 46 (12): 1521-1525.
- WATANABE, T., TAKEUCHI, T., MURAKAMI, A. & OGINO, C., 1980c. The availability of *Tilapia nilotica* of phosphorus in white fish meal. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 46: 897-899.

- WATANABE, T. TAKEUCHI, T., CHANG, Y.F., SATOH, S. & NOSE, T., 1983. Proc. *Jap. Soc. Sci. Fish.* October 1983, p. 91.
- WATANABE, T., VIYAKARN, V., KIMURA, H., OGAWA, K., OKAMOTO, N. & ISO, N., 1992. Utilization of soybean meal as a protein source in a newly developed soft-dry pellet for yellowtail. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 58 (9): 1761-1773.
- WEISBERG, S.B. & LOTRICH, V.A., 1982. Ingestion, egestion, excretion, growth, and conversion efficiency for the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 62: 237-250.
- WEKELL, J.C., SHEARER, K.D. & GAUGLITZ, E.J. Jr., 1986. Zinc supplementation of trout diets: tissue indicators of body zinc status. *The Prog. Fish Cult.*, 48: 205-212.
- WIESMANN, D., SCHEID, H. & PFEFFER, E., 1988. Water pollution with phosphorus of dietary origin by intensively fed rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Aquac.*, 69: 263-270.
- WILSON, R.P., 1985. Amino acid and protein requirement of fish. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell (Eds.). *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, Orlando, FL., pp. 1-16.
- WILSON, R.P., 1986. Protein and amino acid requirement of fishes. *Ann. Rev. Nutr.*, 6: 225-244.
- WILSON, R.P. & HALVER, J.E., 1986. Protein and amino acid requirement of fishes. *Ann. Rev. Nutr.*, 6: 225-244.
- WILSON, R.P. & POE, W.E., 1985a. Apparent digestible protein and energy coefficients of common feed ingredients for channel catfish. *Prog. Fish Cult.*, 47 (3): 154-158.
- WILSON, R.P. & POE, W.E., 1985b. Effect of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities on growth of fingerling channel catfish. *Aquac.*, 46: 19-25.
- WILSON, R.P. & POE, W.E., 1985c. Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp. Bioch. Physiol.*, vol. 80B, n° 2, pp. 385-388.
- WILSON, R.P., ROBINSON, E.H. & POE, W.E., 1981. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for channel catfish. *J. Nutr.*, 111: 923-929.
- WILSON, R.P., ROBINSON, E.H. GATLIN III D.M. & POE W.E., 1982. Dietary phosphorus requirement of channel catfish. *J. Nutr.* 112 (6): 1197-1202.

- WINDELL, J. T., FOLTZ, J.W. & SAROKON, J.A., 1978a. Methods of fecal collection and nutrient leaching in digestibility studies. *Prog. Fish Cult.*, vol. 40 (2): 51-55.
- WINDELL, J. T., FOLTZ, J.W. & SAROKON, J.A., 1978b. Effect of fish size, , temperature and amount fed on nutrient digestibility of a pellet diet by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 613-616.
- YAMADA, K., KOBAYASHY, K. & TOZAWA, H., 1980. Conversion of linolenic acid to w-3 highly unsaturated fatty acids in marine fishes and rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46 (10): 1231-1234.
- YONE, Y. & FUJII, M., 1975a. Studies on nutrition of red sea bream. XI. Effect of w3 fatty acids supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41 (1): 73-77.
- YONE, Y. & FUJII, M., 1975b. Studies on nutrition of red sea bream. XIII. Effect of w3 fatty acid supplement in a corn oil diet on fatty acid composition of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41: 79-86.
- YONE, Y. & TOSHIMA, N., 1979. The utilization of phosphorus in fish meal by carp and black sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 45: 753-756.
- YURKOWSKI, M., BAYLEI, J.K., EVANS, R.E., TABACHEK, J.L., BURTON, J.L. & EALES, J.G., 1978. Acceptability of rapeseed proteins in diets of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Lab. Board Can.*, 35: 951-962.
- ZAR, J.H., 1984. Bioestatistical analysis. (2ª edición). Prentice-Hall. New Jersey, 718 pp.

8. LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Coeficientes de digestibilidad aparente y valores de energía digestible de diferentes ingredientes medidos en trucha arco iris* (CHO, 1991).	14
Tabla 2.	Clasificación de algunas sustancias antinutritivas comunmente encontradas en diferentes ingredientes proteicos y posibles medios de destrucción o de limitación de sus efectos perjudiciales (CHUBB 1982 en Kaushik 1989).	20
Tabla 3.	Ingredientes proteicos de máxima entrada al Puerto de la Luz y de Las Palmas en los años 1988/89 (Información cedida por S.E.N.P.A., Delegación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).	35
Tabla 4.	Cómputo químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de las materias primas a utilizar en los diferentes experimentos, frente a las necesidades en AAE para dorada.	35
Tabla 5.	Composición general de los ingredientes proteicos seleccionados con los que se realizarán los distintos experimentos de este trabajo.	36
Tabla 6.	Mezclas de vitaminas y minerales usadas en la elaboración de los piensos ensayados en los experimentos 1 y 4.	39
Tabla 7.	Mezclas de vitaminas y minerales usadas en la elaboración de los piensos ensayados en todos los experimentos excepto en el 1 y 4.	40
Tabla 8.	Composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos experimentales con harinas de soja y altramuz (g/100 g peso seco).	63
Tabla 9.	Formulación y composición de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de soja y altramuz.	65
Tabla 10.	Composición en aminoácidos esenciales calculados para las dietas experimentales con harinas de soja y altramuz (expresados en % de la proteína).	66
Tabla 11.	Cómputo químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de cada una de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de soja y altramuz, frente a las necesidades en AAE para dorada.	67

Tabla 12. Crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y de la proteína e índice hepatosomático para los piensos experimentales con harinas de soja y altramuz.	69
Tabla 13. Composición corporal y tasa de retención energética de los peces utilizados en el experimento con harinas de soja y altramuz.	72
Tabla 14. Actividades enzimáticas digestivas determinadas en peces alimentados con las dietas experimentales (mU/mg prot. sol.).	72
Tabla 15. Composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos experimentales con harinas de gluten de maíz y carne y huesos (g/100 g peso seco)..	83
Tabla 16. Formulación y composición de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.	84
Tabla 17. Composición en aminoácidos esenciales calculados para las dietas experimentales con harinas de gluten de maíz y carne y huesos (expresados en % de la proteína).	85
Tabla 18. Cómputo químico y porcentaje de deficiencia calculados para el primer aminoácido limitante de cada una de las dietas ensayadas en los experimentos con harinas de gluten de maíz y carne y huesos, frente a las necesidades en AAE para dorada.	86
Tabla 19. Crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y de la proteína e índice hepatosomático para los piensos experimentales con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.	88
Tabla 20. Composición corporal y tasa de retención energética de los peces utilizados en el experimento con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.	91
Tabla 21. Posibles nutrientes limitantes y factores antinutritivos en la harina de soja.	100
Tabla 22. Necesidades de fósforo en la dieta para el crecimiento óptimo de algunas especies de peces.	102
Tabla 23. Disponibilidad de varios tipos de fosfatos para carpa y trucha arco iris (%).	103

Tabla 24. Composición de las materias primas utilizadas en la elaboración de los piensos del experimento de mejora de soja (g/100g peso)	109
Tabla 25. Composición en Ca, P y Zn de las dietas C y S30 utilizadas en el experimento de mejora de soja.	110
Tabla 26. Composición lipídica de los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas ensayadas en el experimento de mejora de soja.	111
Tabla 27. Composición lipídica de las dietas experimentales utilizadas en el experimento de mejora de soja.	112
Tabla 28. Formulación y composición de las dietas ensayadas en el experimento de mejora de la harina de soja.	113
Tabla 29. Crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y de la proteína e índice hepatosomático para los piensos experimentales del ensayo de mejora de soja.	115
Tabla 30. Composición de los músculos de los peces utilizados en el experimento de mejora de la harina de soja (g/100 g de peso seco).	118
Tabla 31. Composición de los hígados de los peces utilizados en el experimento de mejora de la harina de soja (g/100 g peso seco).	118
Tabla 32. Composición de las heces obtenidas en el experimento de digestibilidad con los piensos experimentales que incluyeron harinas de soja y altramuiz.	133
Tabla 33. Coeficiente de digestibilidad aparente de las proteínas y lípidos de las dietas experimentales que incluyeron harinas de soja y de altramuiz.	133
Tabla 34. Formulación y composición de las dietas ensayadas en el experimento de digestibilidad con harinas de gluten de maíz y carne y huesos.	140
Tabla 35. Composición de las heces obtenidas en el experimento de digestibilidad con los piensos experimentales que incluyeron harinas de gluten de maíz y carne y huesos.	141
Tabla 36. Coeficiente de digestibilidad aparente de las proteínas y lípidos y energía digestible de las dietas experimentales que incluyeron harinas de gluten de maíz y carne y huesos.	142

Tabla 37. Formulación y composición de las dietas ensayadas en el experimento de digestibilidad de mejora de la harina de soja.	148
Tabla 38. Cuantificación media diaria de heces y de alimento ingerido para cada uno de los tratamientos ensayados en el experimento de digestibilidad de mejora de la harina de soja.. . . .	149
Tabla 39. Composición (g/100 g peso seco) y contenido en energía de las heces obtenidas para los distintos tratamientos ensayados en el experimento de digestibilidad de mejora de harina de soja.	150
Tabla 40. Coeficientes de digestibilidad aparente, energía digestible y digestibilidad total para los diferentes tratamientos ensayados en el experimento de mejora de la harina de soja.	152
Tabla 41. Excreción de nitrógeno soluble por gramo de nitrógeno ingerido por los peces alimentados con las dietas experimentales de harinas de soja y altramu.	162
Tabla 42. Excreción de nitrógeno soluble por gramo de nitrógeno ingerido por los peces alimentados con las dietas experimentales de harinas de gluten de maíz y carne y huesos.. . . .	169
Anexo I Análisis de la fracción grasa (% del total de ácidos grasos) de la harina de altramu. y de la harina de soja	212
Anexo II Análisis de la fracción grasa (% del total de ácidos grasos) de la harina de sardina, aceite de sardina y EPA.	213

9. LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Rutas en el metabolismo de aminoácidos en peces.	8
Fig. 2. Sistema de tanques utilizado en los experimentos de evaluación nutritiva del alimento.	42
Fig. 3. Sistema de recolección de heces (Guelph System) diseñado por CHO et al., (1975, 1982): A) Desagüe; B) Columna de decantación; C) Vaso recolector.	44
Fig. 4. Sistema de recolección de heces: A) Desagüe; B) Llave; C) Columna de decantación; D) Tubo de centrifugado.	45
Fig. 5. Detalle del sistema de tanques utilizados en todos los experimentos de digestibilidad.	46
Fig. 6. Incremento de peso (% sobre el peso inicial)	70
Fig. 7. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta control.	73
Fig. 8. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S20.	74
Fig. 9. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30.	74
Fig. 10. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta L20.	75
Fig. 11. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta L30.	75
Fig. 12. Incremento de peso (% sobre el peso inicial)	89
Fig. 13. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta G20.	93
Fig. 14. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta G40.	93
Fig. 15. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta M30.	94
Fig. 16. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta M40.	94
Fig. 17. Incremento de peso (% sobre el peso inicial)	116
Fig. 18. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30	120

Fig. 19. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30.	120
Fig. 20. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+P.. . . .	121
Fig. 21. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+Zn.	121
Fig. 22. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+Fitasas.	122
Fig. 23. Tejido hepático de peces alimentados con la dieta S30+n-3/n-6.. . . .	122
Fig. 24. Microvellosidades intestinales en peces alimentados con la dieta C.	123
Fig. 25. Microvellosidades intestinales en peces alimentados con la dieta S30.	123
Fig. 26. Relación entre la composición en ceniza de las dietas y la ADC de las proteínas en el experimento de gluten y carne	146
Fig. 27. Evolución de la excreción N-NH_4^+ de los peces alimentados con las dietas experimentales de soja y altramuz.	160
Fig. 28. Producción acumulada de N-NH_4^+ de los peces alimentados con las dietas experimentales de soja y altramuz.	161
Fig. 29. Relación entre la ADC de las proteínas y la excreción de N-NH_4^+ en el experimento de soja y altramuz	164
Fig. 30. Evolución de la excreción N-NH_4^+ de los peces alimentados con las dietas experimentales de gluten y carne	167
Fig. 31. Producción acumulada de N-NH_4^+ de los peces alimentados con las dietas experimentales de gluten y carne	168

Anexo I. Análisis de la fracción grasa (% del total de ácidos grasos) de la harina de altramuz y de la harina de soja.

Acidos grasos	Harina de altramuz	Harina de soja
12:0	-	-
14:0	0.13	-
14:1	-	-
15:0	0.08	-
16:0	13.30	10.42
16:1n-7	0.51	-
16:1n-5	0.06	-
16:4n-1	-	1.95
17:0	0.08	-
17:1	-	-
18:0	-	3.07
18:0 iso	-	-
18:1n-9	49.63	14.15
18:1n-7	-	-
18:1n-5	0.14	-
18:2n-9	0.13	-
19:0	-	-
18:2n-6	19.10	39.35
18:3n-9	-	-
18:3n-6	-	-
20:0	-	-
18:3n-3	5.32	7.89
18:4n-3	-	-
18:4n-1	-	-
20:1n-11	-	-
20:1n-9	-	-
20:1n-7	3.41	-
20:2n-9	-	-
20:2n-6	0.22	-
20:3n-6	-	-
20:4n-6	-	-
20:3n-3	-	-
20:4n-3	-	-
20:5n-3	-	-
22:0	2.75	-
22:1n-11	-	-
22:1n-9	1.86	-
22:1n-7	1.22	-
22:4n-9	0.13	-
22:5n-6	-	-
22:4n-3	-	-
22:5n-3	-	-
22:6n-3	-	-
Σ Saturados	15.09	13.48
Σ Monoenoicos	55.80	1.95
Σ n-3	5.32	7.89
Σ n-6	19.37	39.88
Σ n-3 HUFA	0.00	0.00

Anexo II. Análisis de la fracción grasa (% del total de ácidos grasos) de la harina de sardina, aceite de sardina y EPA utilizados en los exps. de soja y altramuç.

Acidos grasos	Harina de sardina	Aceite de sardina	EPA
12:0	0.35	0.16	0.32
14:0	11.86	9.08	8.76
14:1	-	0.15	0.55
15:0	0.70	0.48	0.37
16:0	30.05	20.35	9.89
16:1n-7	10.73	10.04	11.44
16:1n-5	0.23	0.18	0.36
16:4n-1	-	-	-
17:0	1.63	1.58	0.15
17:1	1.82	1.83	1.50
18:0	2.35	2.58	4.01
18:0 iso	3.98	3.26	0.62
18:1n-9	7.50	8.98	7.67
18:1n-7	2.81	2.79	2.73
18:1n-5	-	-	-
18:2n-9	-	-	0.32
19:0	0.51	0.37	0.16
18:2n-6	0.99	0.90	1.55
18:3n-9	0.39	0.51	0.35
18:3n-6	0.23	0.29	0.28
20:0	-	0.22	-
18:3n-3	0.45	0.56	1.11
18:4n-3	2.29	3.09	5.23
18:4n-1	0.25	0.32	0.36
20:1n-11	-	-	1.68
20:1n-9	0.98	1.92	0.84
20:1n-7	-	-	-
20:2n-9	0.40	0.44	-
20:2n-6	-	0.10	0.13
20:3n-6	-	-	0.13
20:4n-6	0.70	0.77	0.69
20:3n-3	-	-	-
20:4n-3	0.48	0.78	1.03
20:5n-3	8.41	14.58	21.62
22:0	-	-	-
22:1n-11	0.47	1.39	1.10
22:1n-9	-	0.28	0.17
22:1n-7	-	-	-
22:4n-9	0.35	0.68	0.68
22:5n-6	-	-	-
22:4n-3	-	0.08	-
22:5n-3	0.67	1.32	1.75
22:6n-3	5.36	5.35	7.46
Σ Saturados	51.43	38.08	24.20
Σ Monoenoicos	24.79	27.98	28.40
Σ n-3	17.66	25.76	38.20
Σ n-6	9.62	12.81	10.03
Σ n-3 HUFA	14.92	22.11	31.86