



## MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria, España

2015-2016

### **EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE HYDROXIPROLINA EN DIETAS DE FINALIZACIÓN PARA LUBINA (*Dicentrarchus labrax*) SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CALIDAD DEL FILETE**

SERGIO, PLASENCIA PASÁN

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE  
DEFENDIDA PARA LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE  
MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria  
a 8 de Julio de 2016



## **MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Organizado conjuntamente por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), a través del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE HYDROXIPROLINA EN DIETAS DE FINALIZACIÓN PARA LUBINA (*Dicentrarchus labrax*) SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CALIDAD DEL FILETE

**SERGIO, PLASENCIA PASÁN**

Trabajo realizado en; Universidad de las Palmas de Gran Canaria

De Las Palmas país España, bajo la dirección del Dr. Rafael Ginés Ruiz Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal, Producción Animal y Bromatología y Tecnología de los Alimentos y como codirector Pedro Castro Alonso, Facultad de veterinaria, Departamento de Morfología. Trabajo financiado por el proyecto INIA, nº del proyecto: RTA2013-00075-C03-02, con título: Desarrollo de nuevos productos procedentes de pescado de acuicultura.

Presentado como requisito parcial para la obtención del Título oficial de Máster Universitario en Cultivos Marinos otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Diploma de Master of Science en Acuicultura otorgado por el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM).

Firma tutor 1:

Rafael Ginés Ruiz

Firma tutor 2:

Pedro Castro Alonso

Firma autor:

Sergio Plasencia Pasán

## Agradecimientos

Me gustaría agradecer primeramente a mis tutores, Rafael Ginés y Pedro Castro, por su apoyo a lo largo de la realización del presente escrito. Sus consejos, correcciones y apoyo han hecho posible la entrega de este manuscrito. También destacar el aporte realizado por Lidia Robaina a la hora de preparar las dietas empleadas a lo largo de la experiencia realizada. Por otro lado, me gustaría hacer mención a las técnico del laboratorio del SABE, Carmen Quintana, Andrea Minguella y Guacimara Alejandro Hernández, por sus colaboraciones en los distintos muestreos realizados a lo largo del transcurso del experimento. También agradecer la ayuda en los muestreos realizados a Fabián López Palica, Nabil Oubrayme Reyes, Giuseppe Denti, Rafael Romero García, David Domínguez Montes de Oca e Isabel María Fernández Artilles, así como todo aquel que ha participado en mayor o menor medida en la realización de este trabajo que aquí se archiva. Aprovecho para dar las gracias a todos los profesores que he tenido durante la realización de este master, ya que gracias a sus enseñanzas he conseguido mejorar mis conocimientos e incrementar mi formación. Así como todos aquellos que trabajan en las instalaciones Acuicultura de la Fundación Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, los cuales han sabido orientarme cuando alguna duda ha surgido a lo largo de mi trabajo en dichas instalaciones. Sin olvidar a mis compañeros de máster de los cuales también he podido aprender. Por último y no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia el apoyo que me han demostrado cuando opté por realizar este máster para mejorar mi formación, sin ellos nada de lo aquí presente hubiese sido posible. Todos los aquí nombrados tienen parte de mérito en el trabajo realizado y estoy enteramente agradecido por sus apoyos.

# Índice general

Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	X
1. Introducción	
1.1. Consumo de pescado y sus beneficios.....	1
1.2. Gustos del consumidor.....	3
1.3. Producción de lubina.....	5
1.4. Estructura del músculo en los peces.....	8
1.5. Colágeno, funciones, tipos y composición.....	10
1.6. Textura.....	15
2. Objetivos.....	22
3. Material y métodos.....	23
3.1. Organismos usados y acondicionamiento.....	23
3.2. Dietas empleadas.....	23
3.3. Análisis bioquímico de las dietas.....	23
3.4. Seguimiento de parámetros de cultivo.....	29
3.5. Muestreos realizados.....	31

3.6. Textura.....	34
3.7. Análisis bioquímico del filete.....	36
3.8. Análisis histológico.....	38
3.9. Análisis estadístico.....	46
4. Resultados	
4.1. Crecimiento y utilización del alimento.....	48
4.2. Parámetros de textura analizados.....	51
4.3. Composición proximal y perfil de ácidos grasos.....	53
4.4. Análisis histológico.....	57
5. Discusión.....	62
6. Conclusiones.....	69
7. Bibliografía.....	70

## Índice de figuras

Figura 1: Interacciones de los factores que condicionan la percepción y comportamiento alimenticio de los consumidores (Guerrero, 2001). Pag. 5.

Figura 2: Progresión de la producción de lubina en los distintos países europeos (FEAP, 2015). Pag. 7.

Figura 3: Secuencia de piezas musculares en peces teleósteos. Pag. 9.

Figura 4: Anatomía básica del músculo (Fuente: <http://aqfi.uaex.edu/people/faculty/akelly/z-agoodwin-and-files/Web-Files/Delete/BIOF%20Web%20page%202011/Text/3%20Skin,%20scale,%20muscle/Text3lnk.html>)  
Pag. 10.

Figura 5: Composición del colágeno. Representación esquemática de los distintos aminoácidos que componen el colágeno (Barbul, 2008). Pag. 13.

Figura 6: Formación de Pro e Hyp. Rutas metabólicas mediante las cuales se pueden formar Pro e Hyp (Barbul, 2008). Pag. 14.

Figura 7: Ganancia de peso, conforme más Hyp cristalina se añade (g Hyp/kg de dieta) (Aksnes *et al.*, 2008). Pag. 15.

Figura 8: Cantidad de fibras de músculo rojo de dos porciones de distintas zonas del besugo del Cantábrico. Tinción Haematoxilina–eosina, 10×. (A) Músculo rojo zona craneal de acuicultura, (B) músculo rojo zona craneal de pesca extractiva, (C) músculo rojo zona caudal de acuicultura y (D) músculo rojo zona caudal de pesca extractiva (Rincón *et al.*, 2016). Pag. 17.

Figura 9: Comparación de fibras musculares blancas y rojas, en diferentes partes del filete, entre besugo del Cantábrico de pesca extractiva frente al de acuicultura (Rincón *et al.*, 2016). Pag. 18.

Figura 10: Gráfica en la que se representa como a mayor contenido en grasa en el músculo ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) la fuerza de compresión de 7,5 mm (N) realizada con el texturómetro fue menor (Andersen *et al.*, 1997). Pag. 18

Figura 11: Modificación de los distintos parámetros correspondientes con la textura en dorada (hardness=dureza, fracturability=fracturabilidad, gumminess=gomosidad, chewiness=masticabilidad), en función del tiempo transcurrido tras su muerte y almacenado en frío (Caballero *et al.*, 2009). Pag. 19

Figura 12: Metodología para la cuantificación del contenido en lípidos y ácidos grasos. 1, 2, 3 y 4 (pasos y aparatos de la extracción de lípidos), 5, 6 y 7 (metilación para determinar los FAMES). Pag. 26.

Figura 13: Pesafiltros utilizados para determinación de la humedad en las dietas. Pag. 27.

Figura 14: Metodología para la determinación de proteínas. 1 (catalizador de cobre y selenio), 2 (picador de cocina), 3( anotación de pesos analizados), 4 (incorporación de las dietas pesadas en los respectivos tubos), 5 (digestión ácida), 6 (valoración ácido clorhídrico), 7 (enfriamiento tras las digestión ácida), 8 (incorporación de ácido bórico e indicador mixto 4,8), 9 (destilador Kjeltac™ 2100 de la marca FOSS) y 10 (fórmula de % de proteína). Pag. 28.

Figura 15: Oxímetro. La temperatura es medida en °C y la concentración de oxígeno en mg/L. Pag. 30.

Figura 16: Evolución de la temperatura a lo largo del experimento. Pag. 30.

Figura 17: Evolución de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del experimento. Pag. 31

Figura 18: Muestreos de peso. 1 (tanque de recuperación), 2 (toma de pesos de los organismos), 3 (vaciado de los tanques) y 4 (empaquetado de los organismo sacrificados). Pag. 33.

Figura 19: Toma de muestras. 1 (material de disección), 2 (toma de peso de lubinas sacrificadas), 3, 4 y 6 (extracción de muestras), 5, 8 y 9 (etiquetado de muestras) y 7 (limpieza de las muestras). Pag. 33.

Figura 20: Texturómetro y toma de texturas. 1 (texturómetro), 2 (toma de textura pez entero), 3 (porciones filete crudas), 4 (toma de textura del filete en crudo), 5 (porciones del filete cocinadas) y 6 (toma de textura del filete cocinado). Pag. 35.

Figura 21: Gráfica de textura y cálculos necesarios para los parámetros obtenidos de la medición. Capacidad de fracturar = Force 1 (F1), Dureza = Force 2 (F2), Elasticidad =  $(\text{Time 3} - \text{Time 2}) / \text{Time 1}$ ,  $(L2/L1)$ , Cohesión =  $(\text{Area 5:6} + \text{Area 6:7}) / (\text{Area 1:2} + \text{Area 2:3})$ ,  $(A1/A2)$ , Gomosidad =  $\text{Force 2} * [(\text{Area 5:6} + \text{Area 6:7}) / (\text{Area 1:2} + \text{Area 2:3})]$ ,  $[H1 * (A1/A2)]$ , Masticabilidad =  $\text{Force 2} * [(\text{Area 1:2} + \text{Area 2:3}) / (\text{Area 5:6} + \text{Area 6:7})] * [(\text{Time 3} - \text{Time 2}) / \text{Time 1}]$ ,  $[H1 * (A1/A2) * L2/L1]$ , Adhesividad =  $\text{Area 3:4}$ ,  $(A3)$ , Resistencia =  $\text{Area 2:3} / \text{Area 1:2}$ ,  $(A5/A4)$  (Ginés et al., 2004). Pag. 35.

Figura 22: Procesamiento de las lubinas sacrificadas. 1 (limpieza de los filetes), 2 (picadora de cocina), 3 (almacenamiento del puré de la homogeneización), 4 (placas Petri usadas para el NIR), 5 (NIR) y 6 (base de datos). Pag. 37.

Figura 23: Determinación de cenizas. 1 (crisoles), 2 (estufa), 3 (deseCADador y balanza) y 4 (mufla 600°C). Pag. 38.

Figura 24: Procesamiento de muestras histológicas y realización de cortes histológicos. 1 (muestras fijadas), 2 (limpieza y rasurado de músculo), 3 (procesador de tejidos), 4 (realización de bloques de parafina), 5 (bloques de parafina), 6 (piramidación y eliminación de parafina sobrante), 7 (baños de Poly-L-Lysine) y 8 (realización de cortes de 3 µm). Pag. 39

Figura 25: Tinción de Hematoxilina-Eosina. Pag. 40

Figura 26: Comparación de las tinciones de tricrómico probadas. A (tinción tricrómico azul de anilina) y B (tinción tricrómico verde luz) 10x. Pag. 42.

Figura 27: Tinción tricrómico de Masson. (\*\*\*, la misma tinción cambiando el azul de anilina por verde luz durante 2 minutos). Pag. 42.

Figura 28: Tinción de inmunohistoquímica de colágeno I. Pag. 44.

Figura 29: Tinción de inmunohistoquímica de colágeno IV. Pag. 45.

Figura 30: Realización de fotos y procesamiento de imágenes. 1 (cortes teñidos), 2 (realización de fotos), 3 (imagen sin usar Picasa 3), 4 (imagen usando Picasa 3) y 5 (medición del área ocupada por el colágeno). Pag. 46.

Figura 31: Progresión del peso ganado a lo largo de la experiencia realizada. Pag. 49.

Figura 32: Diferencias en la composición de ácidos grasos en los filetes de lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales ( $\Sigma$ SAT: sumatorio de ácidos grasos saturados;  $\Sigma$ MONO: sumatorio de ácidos grasos monoinsaturados;  $\Sigma$ N-6: sumatorio de ácidos grasos omega-6; EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ácido docosahexaenoico (22:6n-3) (Diferentes letras dentro de cada grupo indican diferencias significativas;  $P < 0,05$ ). Pag. 56.

Figura 33: Área ( $\mu^2$ ) ocupada por el colágeno en el músculo blanco en las preparaciones inmunohistoquímicas (colágeno I y IV) y con tricrómico (Diferentes letras dentro de cada grupo indican diferencias significativas;  $P < 0,05$ ). Pag. 58.

Figura 34: Área ( $\mu^2$ ) ocupada por el colágeno en el músculo rojo en las preparaciones inmunohistoquímicas (colágeno I y IV) y con tricrómico (Diferentes letras dentro de cada grupo indican diferencias significativas;  $P < 0,05$ ). Pag. 58.

Figura 35: Comparaciones de la organización de los paquetes de las fibras musculares, para el colágeno I y IV del músculo rojo. (A: Colágeno I dieta control; B: colágeno I dieta HH; C: colágeno IV dieta control; D: colágeno IV dieta HH) (tinción inmunohistoquímica a 10x). Pag. 60.

Figura 36: Comparaciones de muestras de tejido muscular blanco (A: colágeno I dieta control; B: colágeno I HH; C: colágeno IV tratamiento control; C: colágeno IV dieta HH). Pag. 60.

Figura 37: Comparaciones de musculo rojo y blanco para las tinciones realizadas con tricrómico de Masson (A: músculo rojo dieta control; B: músculo rojo tratamiento HH; C: músculo blanco dieta control; D: músculo blanco tratamiento HH). Pag. 61.

## Índice de tablas

Tabla I: Producción de lubina en los principales países europeos productores de lubina de crianza (FEAP, 2015). Pag. 7.

Tabla II: Tipos de colágeno (Belitz y Gorsch, 1988). Pag. 12.

Tabla III: Valores de fuerza de ruptura de los filetes (Suárez et al., 2006). Pag. 19.

Tabla IV: Ingredientes utilizados para la formulación de las dietas experimentales. Pag. 24.

Tabla V: Composición proximal (%) y perfil de ácidos grasos (g/100 g de grasa) de las dietas experimentales. Pag. 29

Tabla VI: Peso (g), tasa de crecimiento estándar SGR, índice de conversión de alimento FCR y consumo medio diario CMD (g/día) durante los distintos periodos del experimento. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=60). Pag. 49.

Tabla VII: Ecuaciones de predicción para el peso (g) en función de los días de experimentación. Pag. 50.

Tabla VIII: Valores de  $t_{exp}$  obtenidos en la comparación de pendientes para el peso. Pag. 50.

Tabla IX: Parámetros de textura (N) en pez entero, filete crudo y filete cocinado de lubina alimentada con las distintas dietas experimentales. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=15). Pag. 51.

Tabla X: Matriz de correlaciones (coeficiente de Pearson; significación) entre peso, variables de composición proximal y de textura (n=60). Pag. 52.

Tabla XI: Composición proximal (en porcentaje sobre peso húmedo) y de colágeno en los filetes de lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=15). Pag. 55.

Tabla XII: Perfil de ácidos grasos (g de ácido graso/100 g grasa) en los filetes de lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=15). Pag. 56.

## Lista de abreviaturas

°C: grados centígrados

aa: aminoácido

ADSA: Alevines y Doradas S.A.

a.g.: ácido graso

Ala: aminoácido alanina

BHT: Butilhidroxitolueno

C: dieta control

CMD: Consumo medio diario

DHA: ácido graso docosahexaenoico

EPA: ácido graso eicosapentaenoico

*et al.*: y otros

FAMES: Fatty acid methyl ester (éteres metílicos de ácidos grasos)

FCR: Factor de conversión del alimento

g: gramo

Gly: aminoácido glicina

h: horas

HH: dieta con un 2 % de Hyp

HL: dieta con un 0,6 % de Hyp

HM: dieta con un 1,2 % de Hyp

huevos/kg: huevos producidos por kilogramo de hembra

HUFA: Highly Unsaturated Fatty Acids (ácidos grasos insaturados de cadena larga)

Hyp: aminoácido hydroxyprolina

L: litro

L/s: litro por segundo

mg/d: miligramos por día

mm: milímetro

*n*-3: omega tres

*n*-6: omega seis

NIR: Near-infrared spectroscopy

nm: nanómetro

P4H: Prolyl 4-Hydroxylase  $\alpha$

Pro: aminoácido prolina

r.p.m.: Revoluciones por minuto

SGR: Tasa de crecimiento de la especie

Tm: tonelada

## Resumen

Uno de los objetivos en los que se centra las industrias acuicultoras para conseguir una mejoría del producto, es la textura. Dicha cualidad se ve alterada por gran cantidad de factores, entre ellos se encuentra la concentración de colágeno en el tejido muscular. Dicha proteína se forma a partir de aminoácidos, siendo la hidroxiprolina (Hyp) uno de los más abundantes en su composición. Se incluyeron distintas concentraciones de dicho aminoácido en piensos, comparando una dieta control (C) y otras tres con diferentes porcentajes de Hyp, 0,6 (dieta HL), 1,2 (dieta HM), y 2 % (dieta HH), con el objetivo de apreciar su efecto en lubinas adultas ( $609,21 \pm 75,39$  g), durante un periodo de 143 días. Se analizaron datos de crecimiento, utilización de alimento, textura, composición bioquímica del filete y área del colágeno en cortes de músculo. Los peces tratados con Hyp obtuvieron mejores tasas de crecimiento (SGR) (HM: 0,63 y HH: 0,6) durante el último período de experimentación, así como un mejor índice de conversión del alimento (FCR) (HM: 3,09 y HH: 3,01) durante la fase intermedia del experimento (desde el inicio hasta los 99 días). Por otro lado, se obtuvieron valores mayores en el área ocupada por el colágeno en las fibras del músculo blanco y rojo ( $P < 0,05$ ) de peces tratados con Hyp, siendo los valores en el músculo blanco donde el colágeno IV destacó junto al colágeno I. A pesar de la relación que existe entre el colágeno intramuscular y la textura del filete, es destacable el aumento de diámetro en las fibras musculares en peces tratados con Hyp, hecho que puede estar relacionado con la falta de diferencias en la textura entre los distintos tratamientos. Se puede decir que la inclusión de Hyp en dietas de lubina fomenta la formación de colágeno intramuscular.

## Abstract

Aquaculture industry has many aims, but it focus in some objectives, texture is one of them. This way they can improve the quality. Many factors change the texture, between them there is concentration of collagen in muscle tissue. This protein is formed by amino acids, hydroxipoline (Hyp) is one of these amino acids and it is one of the most abundant in collagen. Different concentrations were included in animal food, being developed a control diet (C) and other three diet with different percentage of Hyp, 6 (diet HL), 1,2 (diet HM) and 2% (diet HH), with the aim to see their effect in mature sea bass ( $609,21 \pm 75,39$  g), over 143 days. Data about growth, feed utilization, texture, biochemical composition of fillet and area of collagen in cuts of muscle were analyzed. Fish fed with Hyp had better rate of growth (SGR) (HM: 0,63 y HH: 0,6) over the last period of the experiment. In addition, these fish had better conversión rate (FCR) (HM: 3,09 y HH: 3,01) during intermediate phase (from beginnig to 99 days). On the other hand, we obtained greater values in area of collagen in white and red muscle ( $p < 0,05$ ) for fish feed with Hyp, collagen I and IV were notable in white muscle. Despite a connection between collagen intramuscular and texture about fillet, it is also noteworthy that greater increase in fiber muscle diameter in fishes fed with Hyp, this may be related to the lack of difference in texture between different treatments. It may be said that the inclusion of Hyp in diets from sea bass increases formation of collagen intramuscular.

## 1. Introducción

### 1.1. Consumo de pescado y beneficios.

El pescado, una fuente de ácidos grasos (a.g.) esenciales de origen marino como son el a.g. eicosapentaenoico y el a.g. docosahexaenoico (EPA y DHA), así como un aporte de proteínas, vitaminas y minerales, es un componente esencial en una dieta saludable. Entre la gran cantidad de estudios que se han publicado, se pueden encontrar un gran número de beneficios que aporta el consumo de pescado en el ser humano. Las principales ventajas de este consumo se centran en aspectos positivos en el sistema cardiovascular (Baumann *et al.*, 1999; Von Schacky *et al.*, 1999; Erkkilä *et al.*, 2004; López-García *et al.*, 2004; Kamphuis *et al.*, 2006; He, 2009; He *et al.*, 2009; Riediger *et al.*, 2009; Abeywardena y Patten, 2011; Raatz *et al.*, 2013). Además también se han demostrado sus efectos saludables en trastornos de alimentación como diabetes u obesidad. Así como, la disminución de colesterol en la sangre, de accidentes cerebrovasculares y la de partos prematuros o mejora del desarrollo cognitivo (Daviglius *et al.*, 2002; Patterson, 2002; Bouzan *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2005a, b, c; König *et al.*, 2005; McMichael y Butler, 2005; Willett, 2005; Rossary *et al.*, 2014).

A pesar de estos beneficios, el consumo de pescado no está muy extendido en la población mundial. Se han realizado estudios en varios puntos del planeta, descubriendo un gran déficit del consumo de este alimento. Sin embargo, regiones como Japón o Groenlandia presentan una gran tasa de consumo de pescado y también un menor número de muertes debido a infartos de miocardio (Kagawa *et al.*, 1982; Sekikawa *et al.*, 2008; Usydus *et al.*, 2009). Por otro lado, en regiones donde el pescado no está en el menú habitual de una familia, como es el caso de Australia, donde solo una quinta parte de los hogares consumen la dosis recomendada de pescado, existen más casos de infartos de miocardio. Los padres australianos conocen los beneficios de consumir pescado y también están informados de la fuente de contaminantes que pueden ser estos animales. Las estrategias que tienen como objetivo cambiar el comportamiento alimenticio de los niños, deben centrarse en identificar las barreras para consumir alimentos ricos

en ácidos grasos omega-3 (*n*-3), incluyendo el mal gusto de algunas familias por el pescado, inconvenientes asociados con la preparación (olor, espinas, textura), la falta de procesos de cocinado y limitaciones de coste (Rahmawaty *et al.*, 2013). Se ha constatado que un consumo de pescado de 250 mg/d de los ácidos grasos EPA y DHA, mitiga los infartos de miocardio en la población y se consigue un máximos de beneficio con unos 500 mg/d de EPA+DHA (Mozaffarian y Rimm 2006; Harris *et al.*, 2008; 2009).

Es evidente que algo no funciona, ya que se han constatado datos de encuestas en las que más del 40% de la población de ciertos países, no consume la cantidad de aceites esenciales *n*-3 recomendada. Este hecho se debe principalmente a la información de los peligros de consumir pescado, principalmente contaminantes como son metilmercurio, bifenilos policlorados (PCB), dioxinas, plaguicidas organoclorados y otros contaminantes del medio ambiente (Verbeke *et al.*, 2005). Se ha demostrado, que las noticias de peligro, daños o todo aquello que conlleva un mal para la población, condicionan a los consumidores (Carson y Hassel, 1994; Robenstein y Thurman, 1996; Kinnucan *et al.*, 1997). El peso de una noticia, la cual informa que ingerir pescado puede reducir considerablemente el número de fallecimientos debido a infartos de miocardio, es de cinco a siete veces menos influenciable en las decisiones del consumidor, que la información de los dañinos que son los contaminantes para la salud humana (Mizerski, 1982; Verbeke y Ward, 2001). Por dicho motivo la población tiende a no consumir pescado con el fin de evitar la toma de contaminantes, olvidando lo beneficios que les puede aportar el consumo de pescado en su salud (Bouzan *et al.*, 2005; Verbeke *et al.*, 2005).

A pesar de estos datos de ingesta de pescado, cabe destacar que en las últimas cinco décadas la producción de peces comestibles se ha incrementado considerablemente, como demuestra el último informe de la FAO (FAO, 2014), presentando una tasa media anual del 3,2 %, superando así la tasa de crecimiento de la población mundial del 1,6 %. En lo referente al consumo aparente mundial de pescado per cápita, aumentó de un promedio de 9,9 kg en 1960 a 19,2 kg en 2012.

Este aumento destacado se ha debido a una combinación de crecimiento demográfico, aumento de los ingresos y urbanización, la fuerte expansión de la producción pesquera y la mayor eficacia de los canales de distribución, también han sido unos potenciadores notables. Por lo que se puede apreciar, la producción en términos generales es elevada. Sin embargo, al centrarse en los principales productores industrializados regionales, Estados Unidos de América, España, Francia, Italia, Japón y la República de Corea, la producción de peces de consumo ha disminuido en los últimos años. Una de las causas de estos descensos de producción, se atribuyen al pescado importado procedente de otros países, en los cuales los costos de producción son relativamente bajos (FAO, 2014). Por lo que se puede argumentar, poco a poco la población está más concienciada de la importancia del consumo de pescado para tener una dieta saludable y beneficiarse de dicha alimentación, aunque las preferencias del consumidor pueden variar dependiendo de la procedencia del producto. Por otro lado, este aumento del consumo de pescado también se debe en gran medida al incremento de la población mundial, posicionando a la acuicultura como uno de los posibles futuro para abastecer la demanda alimenticia mundial (FAO, 2014).

## 1.2. Gustos del consumidor.

Aunque el consumo de pescado se ha incrementado, la polémica del pescado de acuicultura aún sigue presente, siendo estos productos menos apreciados por la población. Efectivamente, hay estudios que demuestran que a pesar de no contar con una imagen negativa, en general, los consumidores de Europa prefieren los productos de pesca extractiva, los cuales perciben como un género de mejor calidad (Kole, 2003; Verbeke *et al.*, 2007; Claret *et al.*, 2014). Entre los españoles se percibe a los productos de la acuicultura como un género fácil de encontrar, económico y que se ha cultivado de una manera controlada. Por otro lado, también se le atribuye un alto contenido en grasas y antibióticos, así como un carácter artificial al producto y una mayor manipulación del artículo. Por lo que respecta al pescado de origen salvaje, se le atribuyen una gran cantidad de aspectos positivos, mejor calidad, mejoras en el sabor y textura de la carne, más saludable y

fresco. También cabe destacar que el hecho de que estos peces presenten una alimentación a través del ambiente, provoca la creencia de que dichos productos serán más nutritivos y saludables, creando unas garantías en el consumidor con respecto a este género. Por otro lado, como imagen negativa de la pesca extractiva, argumentan la presencia de metales pesados y pesticidas debido a la contaminación marina, así como de parásitos como es el anisakis. Por lo que se puede apreciar, si los consumidores tienen información de la especie así como el método de obtención del producto, prefieren pescado de pesca extractiva. Sin embargo, se han realizado degustaciones de pescado salvaje frente a cultivados, sin el conocimiento de origen de los productos por parte de los encuestados, obteniendo preferencias de los participantes por el pescado de origen acuícola (Claret, 2014). Es destacable comentar que a pesar de que el 96% de la población española consume pescado, no todos los consumidores conocen la existencia de pescado de acuicultura (Luna *et al.*, 2004). Estos hechos dan una idea clara de que la imagen de la acuicultura necesita mejorar, de esta manera la percepción de los consumidores sobre este producto incrementará y consecuentemente fomentará el consumo de pescado de acuicultura.

No solo estas comparaciones son la causa de la mala imagen de la acuicultura, en España se ha registrado un desconocimiento generalizado del origen del pescado por una parte importante de la población (García-García *et al.*, 2008). Cabe destacar, como dato impactante, que un 25 % de la población española desconoce la existencia del pescado de acuicultura y más de un 40% consideran a especies como de crianza, cuando no lo son realmente (Luna *et al.*, 2004). Es evidente que existe un desconocimiento importante en lo que se refiere al mundo de la acuicultura, sus implicaciones en la población, así como los beneficios de su consumo respecto a los productos de la pesca extractiva.

A pesar de los claros déficits de conocimiento de los beneficios del consumo de pescado, así como de las negativas creencias sobre el pescado de acuicultura, la necesidad de conocer las opiniones del consumidor son esenciales para poder crear una imagen positiva de este producto,

así como mejorar la calidad del producto atendiendo a los gustos del consumidor. Los consumidores perciben y aceptan o rechazan un producto en función de varios factores (Costell *et al.*, 2010), dichos factores se pueden agrupar en tres; sensoriales (donde el consumidor se deja llevar por lo que sus sentidos perciben; vista, olfato, sabor), psicológicos (en este caso el consumidor, para la selección de un producto se basa en ideas preconcebidas, como puede ser el no consumo de pescado por los niveles de contaminantes que puede tener dicho producto) y marketing (en este factor lo que influye en la selección son etiquetas, marcas, precios, información y demás atribuciones que se les da a los productos con el fin de darle un valor añadido al producto) (Guerrero, 2001). Dichos factores, relacionados entre ellos (Figura 1), condicionan la percepción del producto, así como en el comportamiento alimenticio del consumidor, pudiendo crear una imagen positiva del producto en función de las ideas de los consumidores.

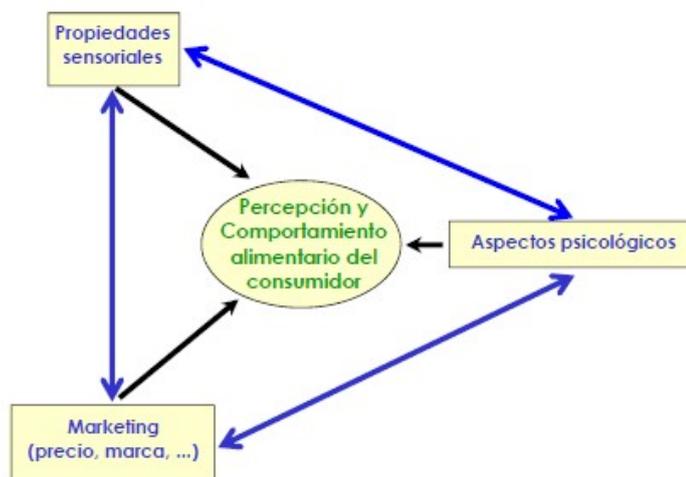


Figura 1: Interacciones de los factores que condicionan la percepción y comportamiento alimenticio de los consumidores (Guerrero, 2001).

### 1.3. Producción de lubina.

La lubina (*Dicentrarchus labrax*), es una especie pelágica y litoral que se puede encontrar en las costas orientales del océano Atlántico, canal de la Mancha y mar Báltico, desde Noruega hasta Marruecos, y a lo largo del mar Mediterráneo. Suele frecuentar estuarios y lagunas litorales, pudiendo tolerar una extensa variación de temperatura y salinidad de las aguas que habita. Esta

especie es apta para la procreación al alcanzar los 2 – 4 años, generalmente. La longevidad de estos peces se estima en 30 años (APROMAR, 2015).

La morfología que presenta dicha especie es la propia para el ciclo de vida del organismo. Presentan un cuerpo fusiforme y vigoroso, el cual les facilita la natación, cubierto de grandes escamas. Poseen una cabeza puntiaguda, que otorga un carácter hidrodinámico, con aberturas nasales y ojos pequeños, así como una boca grande. La coloración es de un gris plomizo, siendo más oscura en la partes dorsal y cambiando a un tono plateado en los laterales. Una característica propia de la especie es la presencia de una mancha negra encima del opérculo. Por lo que se refiere a la aleta caudal, presenta una forma ligeramente ahorquillada. Cabe destacar que estos organismos pueden alcanzar los 70 cm de longitud (APROMAR, 2015).

En lo que se refiere al cultivo, su crianza se realiza en casi todos los países de Mediterráneo (un total de 19 países). Los criaderos producen huevos a partir de reproductores en condiciones muy controladas, cada hembra puede llegar a poner 250000 huevos/kg, siendo los huevos de 1mm de diámetro. A lo largo del primer mes de vida las larvas se alimentan con cultivos auxiliares: rotíferos y artemia. Tras el cual pasan a ser alimentados con piensos producidos con ingredientes de origen natural. Las instalaciones donde tiene lugar la crianza pueden ser en jaulas flotantes en el mar, como en tanques de hormigón o estanques en tierra. Estos organismos tras eclosionar del huevo tardan unos 20 – 24 meses en alcanzar un peso de 400 g, sin embargo la talla de comercialización está comprendida desde los 250 g hasta más de 1500 g (APROMAR, 2015).

En los últimos años su producción a nivel europeo se ha incrementado considerablemente (Figura 2), alcanzando en todo el mundo una producción de 157.516 Tm. La lubina de origen pesquero sigue siendo extraída en diversos países del Mediterráneo y del Atlántico, aunque su volumen a medio plazo permanece relativamente constante, rondando las 758 Tm. Cabe destacar que la lubina de crianza supone el 94,4 % del total de lubina comercializada (APROMAR, 2015). Dentro

de Europa, España es el tercer productor, superada solamente por Turquía y Grecia (Tabla I), con un aumento considerable de la cantidad de toneladas producidas desde el 2005 al 2014, pasando de 5.492 Tm a un total de 17.376 Tm respectivamente.

Tabla I: Producción de lubina de crianza en los principales países europeos (FEAP, 2015).

PRODUCTION (tons)		YEAR				
SPECIES	COUNTRY	2005	2006	2012	2013	2014
Sea Bass	TURKEY	37.290	38.408	65.512	67.912	74.653
	GREECE	35.000	45.000	41.500	48.000	42.000
	SPAIN	5.492	8.930	14.270	14.700	17.376
	ITALY	9.100	9.300	7.200	6.800	6.500
	FRANCE	4.300	5.585	2.300	1.970	2.021
	CROATIA	1.850	2.000	2.375	3.014	3.500
	CYPRUS	583	589	1.096	1.621	1.817
	PORTUGAL	1.530	1.584	500	400	500
Sea Bass Total		95.145	111.396	134.753	144.417	148.367

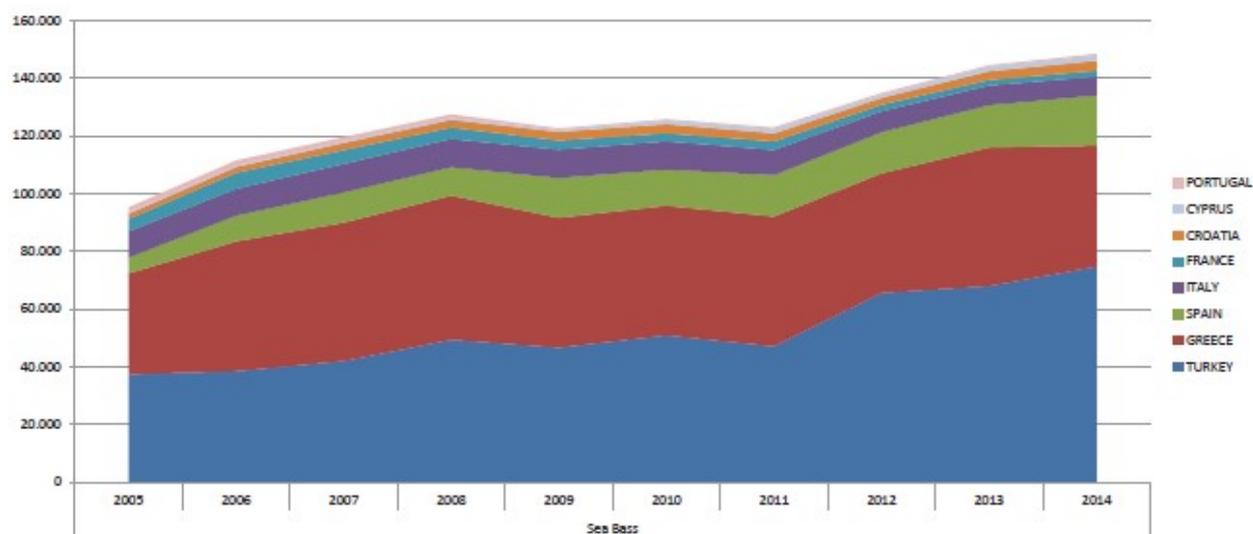


Figura 2: Progresión de la producción de lubina en los distintos países europeos (FEAP, 2015).

Visto el incremento de la producción, con el fin de potenciar el consumo de productos de acuicultura, se debería mejorar las características sensoriales de los productos (Luna *et al.*, 2004). Las diferencias sensoriales entre las lubinas de origen salvaje y de crianza son evidentes. Dichas diferencias se crean principalmente por el tipo de alimentación de los individuos, encontrando diferencias en el contenido total de lípidos, en la proporción de varios ácidos grasos, así como de

algunos minerales en los análisis realizados en los filetes de origen salvaje y de crianza (Alasalvar *et al.*, 2002). Por otro lado también se han apreciado diferencias entre cultivados y de pesca extractiva en la celularidad del músculo, en el contenido de colágeno, así como en el pH. Estas variaciones afectaron a la textura del filete, siendo los animales de origen salvaje los que presentaron mayores valores de textura. Es destacable que los procesos de cocinado empleados pueden alterar las cualidades de los filetes por lo que el estudio de la textura y la composición del filete tras el cocinado también es una característica a tener en cuenta (Periago *et al.*, 2005). Precisamente el cocinado a partir de filetes de lubina previamente congelados, provocó una masiva coagulación de la proteína, desintegración de las uniones en las fibras musculares y espacios entre las fibras musculares ocupados por material amorfo, cambios estructurales que afectan a la textura y las propiedades organolépticas relacionados con la degradación del colágeno (Ayala *et al.*, 2005).

#### 1.4. Estructura del músculo en los peces.

A diferencia de los animales terrestres, los peces no disponen de un sistema tendinoso que conecte los músculos al esqueleto. Para paliar esta carencia, entre las piezas musculares (miotoma) que recorren en paralelo los laterales del organismo (Figura 3), existen unas láminas de colágeno que realizan la función de los tendones. Dichas láminas reciben el nombre de miocomata (miosepto) (Nurshall, 1956 en Suárez *et al.*, 2007) y actúan como unión entre la piel y el esqueleto, otorgando de esta forma la cohesión necesaria en el cuerpo. Se puede decir que el músculo de los peces está constituido por una secuencia repetida de miotoma y miocomata.



Figura 3: Secuencia de piezas musculares en peces teleósteos.

La unión mencionada entre la piel y el esqueleto divide el cuerpo en dos partes, región epiaxial e hipoaxial, mediante un septum medio horizontal (Figura 4). Entre cada dos miocomatas se dispone un segmento muscular, miotoma (miómero), el cual recorre toda su extensión de forma paralela, entre dichos septos, a lo largo del plano longitudinal del pez (Suárez *et al.*, 2007). Entre miómero y miocomata existe una cohesión facilitada por el colágeno, el cual nace en la miocomata y envuelve las fibras musculares (Love *et al.*, 1969; Love *et al.*, 1972). Esta disposición de miocomatas y miotomas en el cuerpo de los peces está diseñada con el objetivo de facilitar la natación (Nurshall, 1956 en Suárez *et al.*, 2007). De hecho, las fibras musculares (miómeros), ubicadas dentro de los miótomos de forma paralela, son los responsables de favorecer la natación, gracias a su disposición angular.

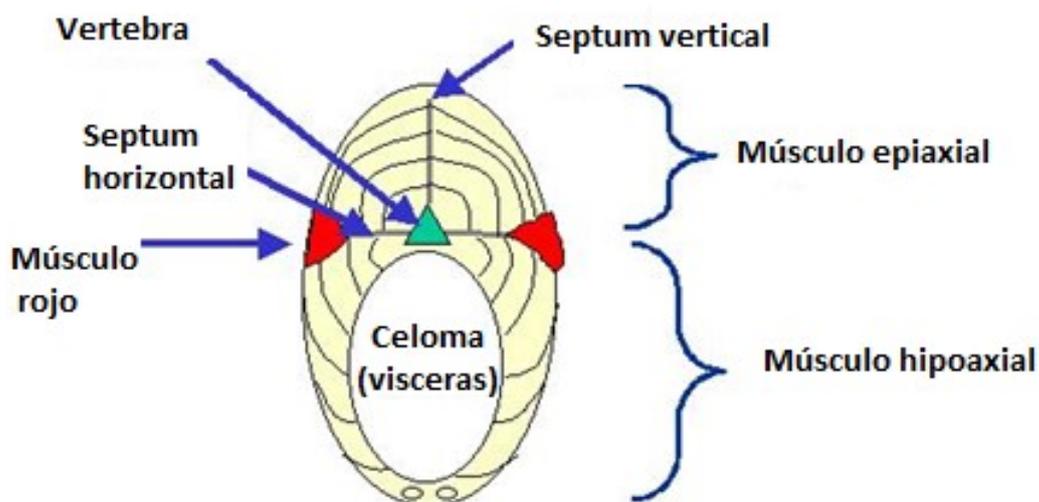


Figura 4: Anatomía básica del músculo. (Fuente: <http://aqfi.uaex.edu/people/faculty/akelly/z-agoodwin-and-files/Web-Files/Delete/BIOF%20Web%20page%202011/Text/3%20Skin,%20scale,%20muscle/Text3Ink.html>).

### 1.5. Colágeno, funciones, tipos y composición.

En el tejido conectivo intramuscular de los peces, se ha demostrado que se encuentra en gran medida constituido por colágeno (Sato *et al.*, 1988; Hatae *et al.*, 1989; Suárez *et al.*, 2007), siendo esta una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular. Tiene papeles muy importantes, tanto estructurales como funcionales en tejidos e influyen en la propiedad de la textura, así como en la funcionalidad y extensibilidad del filete (Hatae *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1988; Aidos *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2007; Gordon y Hahn, 2010). A dicha proteína se la considera fibrosa, encontrándose en gran medida en tendones, miocomatas, piel, huesos, sistema vascular y en las envolturas del tejido conectivo que rodean el músculo. El colágeno está formada por unidades de tropocolágeno (15 Å de diámetro y 3000 Å de longitud), una proteína en forma de varilla y constituida por tres cadenas polipeptídicas, enrolladas formando un cordón de tres hebras, creando una triple hélice. Estas cadenas aminoácidas se las conoce como cadenas  $\alpha$ , cada una de estas formas una hélice con giro a la izquierda con tres aminoácidos por vuelta. La estructura formada por el ensamblaje de dichas cadenas  $\alpha$  es una triple hélice con giro a la derecha. Las cadenas polipeptídicas mencionadas, están unidas

mediante enlaces cruzados covalentes, gracias a las cadenas laterales de lisina e histidina. Dichos enlaces son reducibles y durante la maduración del tejido conectivo van siendo progresivamente modificados por enlaces no reducibles (Lehninger, 1982; Belitz y Gorsch, 1988; Suarez *et al.*, 2007). Estos tipos de enlaces no reducibles son los causantes de la dureza de la carne en animales más viejos, como es en el caso de mamíferos.

Las cadenas  $\alpha$  mencionadas, contienen 100 tipos de restos de aminoácidos, presentando una composición diversa. Esta variedad en la composición de aminoácidos de las cadenas, que forman el tropocolágeno, es la causa de la clasificación del colágeno en cinco tipos principales (Tabla II). Las diferencias entre uno u otro tipo de colágeno, radican en las composiciones moleculares (aminoácidos) de las cadenas  $\alpha$  que los forman. De entre los cinco tipos de colágeno presentes en la Tabla II, el más común es el colágeno tipo I, el cual está formado por dos cadenas  $\alpha$  idénticas y una tercera con una secuencia de aminoácidos distinta. El peso molecular total de cada cadena  $\alpha$  es de 100.000 daltons, lo que deja en total un peso molecular de 300.000 para el colágeno I (Lindent y Lorient, 1996). En el músculo también podemos encontrar otro tipo de colágeno, el cual puede tener un papel importante en la dureza de la carne, dicho colágeno es el tipo III, y está compuesto de 3 cadenas  $\alpha$  idénticas. Por otro lado, tenemos el colágeno IV, el cual consta de una estructura más compleja ya que parece formarse por cadenas polipeptídicas de diferentes tamaños. Los tipos de colágenos nombrados, junto con el colágeno V, se pueden encontrar en el músculo, sin embargo el colágeno tipo II solo se distribuye por el cartílago como se aprecia en la Tabla II. El colágeno V por otra parte parece presentar distintas conformaciones musculares y se le asocia al ablandamiento de la carne almacenada en frío, ya que tiende a degradarse. Sin embargo, dicho colágeno junto con el tipo I parecen ser los más abundantes en el músculo de peces, de hecho la alta proporción de fibras tipo V, conlleva a la formación de fibras delgadas (Ando *et al.*, 1999). Se pueden apreciar diferencias entre peces demersales y pelágicos, siendo los segundos los que presentan un diámetro mayor de las fibras de colágeno, debido a la mayor presencia de colágeno V en las fibras (26 Å frente a 20,6 Å) (Suárez, 2002).

Tabla II: Tipos de colágeno. En función de la composición de las cadenas  $\alpha$  que conformen la unidad del colágeno, se pueden distinguir cinco tipos de colágeno (Belitz y Gorsch, 1988).

Tipo	Cadenas peptídicas	Composición molecular	Distribución
I	$\alpha^1 \alpha^2$	$[\alpha^1 (I)]^2 \alpha^2 (I)$	Piel, tendones, miocomata, huesos y músculos (epimisio).
II	$\alpha^1$	$[\alpha^1 (II)]^2$	Cartilago.
III	$\alpha^1$	$[\alpha^1 (III)]^3$	Piel fetal, sistema cardiovascular, membranas sinoviales, órganos internos y músculos (perimisio).
IV	$\alpha^1 \alpha^2$	$[\alpha^1 (IV)]^3 (?)h (?)$	Membranas basales, cápsula del cristalino, glomérulos, membrana placentaria, pulmones y músculos (endomisio).
V	$\alpha A, \alpha B, \alpha C (?)$	$[\alpha B], \alpha A \text{ el } (\alpha B)^3 + (\alpha A)^3 \text{ el } (\alpha C)^3 (?)$	Membrana placentaria, sistema cardiovascular, pulmones y músculos (endomisio). Son también componentes secundarios de varios tejidos.

Esta proteína, el colágeno, está compuesta por ciertos aminoácidos, siendo el más abundante, representando una tercera parte del total, la glicina (Gly); por lo que cada tercer aminoácido hay una Gly, quedando una fórmula tal que Gly-X-Y (Li *et al.*, 2005). Por otro lado, otra tercera parte está compuesta por alanina (Ala), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp), estos junto con la Gly son los aminoácidos más abundantes en esta proteína (Figura 5). Pro y Hyp ocupan frecuentemente la posición X o Y de la formula molecular, y representan alrededor de un 23% del contenido total de aminoácidos de la molécula de colágeno (Grant y Prockop, 1972). Por un lado, la Pro es clave en múltiples procesos celulares bioquímicos y fisiológicos (Wu *et al.*, 2010); es el principal sustrato nitrogenado para la síntesis de poliaminas (Wu *et al.*, 2000; 2005); junto con un metabolito propio, la pirrolina-5-carboxílico, regulan la expresión génica y la señalización celular de las rutas que son clave para el bien estar del organismo y la defensa contra enfermedades (Hu *et al.*, 2008); es específica de radicales libres (Kaul *et al.*, 2008), los cuales participan en reacciones redox tanto en humanos como en animales (Phang *et al.*, 2008; 2010). Cabe destacar, que mientras que muchos mamíferos pueden sintetizar Pro de la arginina y de la glutamina/glutamato (Figura 6), la relación de síntesis endógena no es adecuada para recién nacidos, aves y peces (Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Sin embargo se ha podido demostrar que la suplementación de Pro en la dieta

mejora la ganancia de peso en gallinas y cerdos jóvenes diariamente (Graber *et al.*, 1970; Kirchgessner *et al.*, 1995), así como un aumento de la concentración de colágeno muscular en juveniles de rodaballo con una suplementación de cristales de L-Pro y L-Hyp (Zhang *et al.*, 2015). Por lo tanto se puede considerar a la Pro como un aminoácido potencialmente esencial para mamíferos, aves y especies acuáticas (Baker, 2009; Wu *et al.*, 2010). Por lo que respecta a la Hyp es un metabolito postraducciona de la Pro en proteína (principalmente colágeno), formado a partir de la prolil hidroxilasa dependiente de la vitamina C (Stanley, 1983), formándose Hyp en estado libre, a partir de la degradación de colágeno o de otras proteínas mediante prolil hidroxilasa (Phang *et al.*, 2008, 2010). Cabe destacar, que a la Hyp se la considera como un aminoácido esencial condicional (Li *et al.*, 2009), y su contenido en el filete de pescado es mucho mayor que en las fuentes proteínicas de origen vegetal (Li *et al.*, 2011).

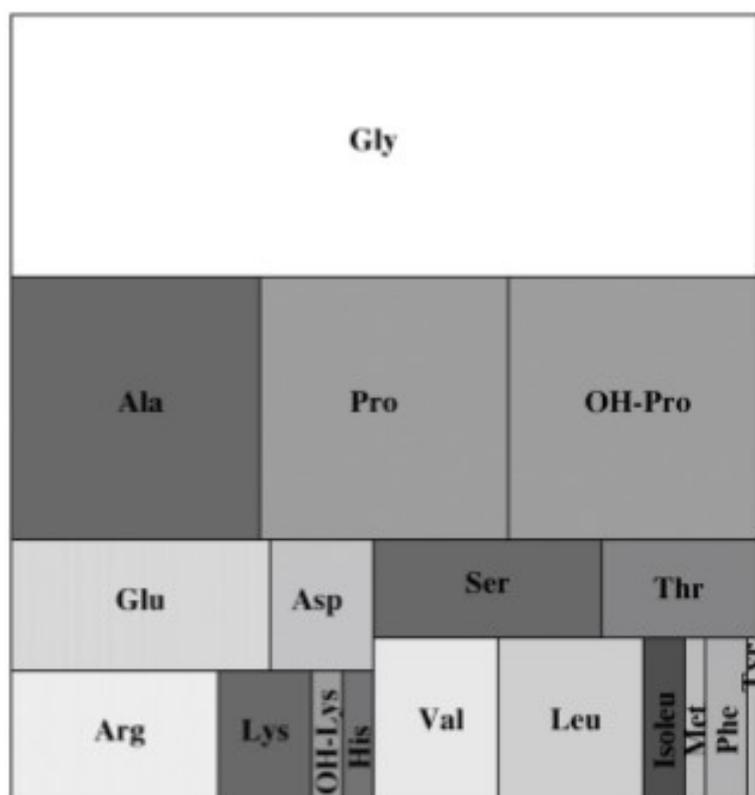


Figura 5: Composición del colágeno. Representación esquemática de los distintos aminoácidos que componen el colágeno (Barbul, 2008). [Gly = glicina; Ala = alanina; Pro = prolina; OH-Pro = hidroxiprolina; Glu = ácido glutámico; Asp = ácido aspártico; Ser = serina; Thr = treonina; Arg = arginina; Lys= lisina; OH-Lys = hidroxilisina; His = histidina; Val = valina; Leu = leucina; Isoleu = isoleucina; Met = metionina; Phe = fenilalanina; Tyr = tirosina].

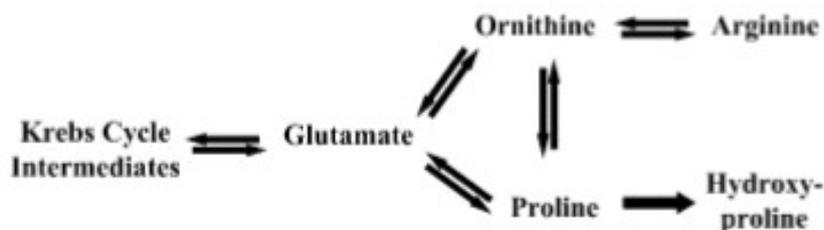


Figura 6: Formación de Pro e Hyp. Rutas metabólicas mediante las cuales se pueden formar Pro e Hyp (Barbul, 2008).

La Pro y la Hyp son dos aminoácidos necesarios para mantener la estructura y función celular, dichos aminoácidos son vitales para la síntesis del colágeno, la estructura y la fuerza de esta proteína (Barbul, 2008). Gracias a estudios realizados en distintas especies, se les considera potencialmente esenciales para los mamíferos, aves y especies acuáticas (Zhang *et al.*, 2006; Baker, 2009; Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Por lo que se refiere a especies acuáticas se han llevado estudios de inclusiones en dietas de Pro, Hyp o ambas, en salmón (*Salmo salar*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Son variados los resultados obtenidos según la especie investigada. En salmón se ha demostrado que cierta suplementación con cristales de Hyp a una dieta basada en proteína vegetal mejoró la ganancia de peso (Figura 7), sin embargo no se apreció mejora alguna con la inclusión de Pro (Aksnes *et al.* 2008). Por otro lado según Zhang y colaboradores (2015), la inclusión de L-Pro y L-Hyp en dietas con alta cantidad de proteína vegetal para juveniles de rodaballo, mejoraron significativamente la concentración total de colágeno en el músculo, lo cual puede ser debido al incremento de la síntesis y la degradación del colágeno, sin embargo no se apreció un efecto positivo en el crecimiento (Zhang *et al.*, 2013). Este aumento de la concentración de colágeno puede afectar a las características del filete tales como la textura, el sabor, etc (Zhang *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el contenido de colágeno y sus características son un determinante importante de la firmeza del músculo del pescado (Moreno *et al.*, 2012).

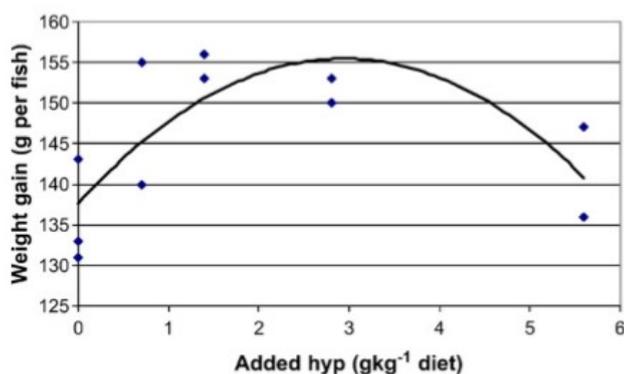


Figura 7: Ganancia de peso, conforme más Hyp cristalina se añade (g Hyp/kg de dieta) (Aksnes *et al.*, 2008).

## 1.6. Textura.

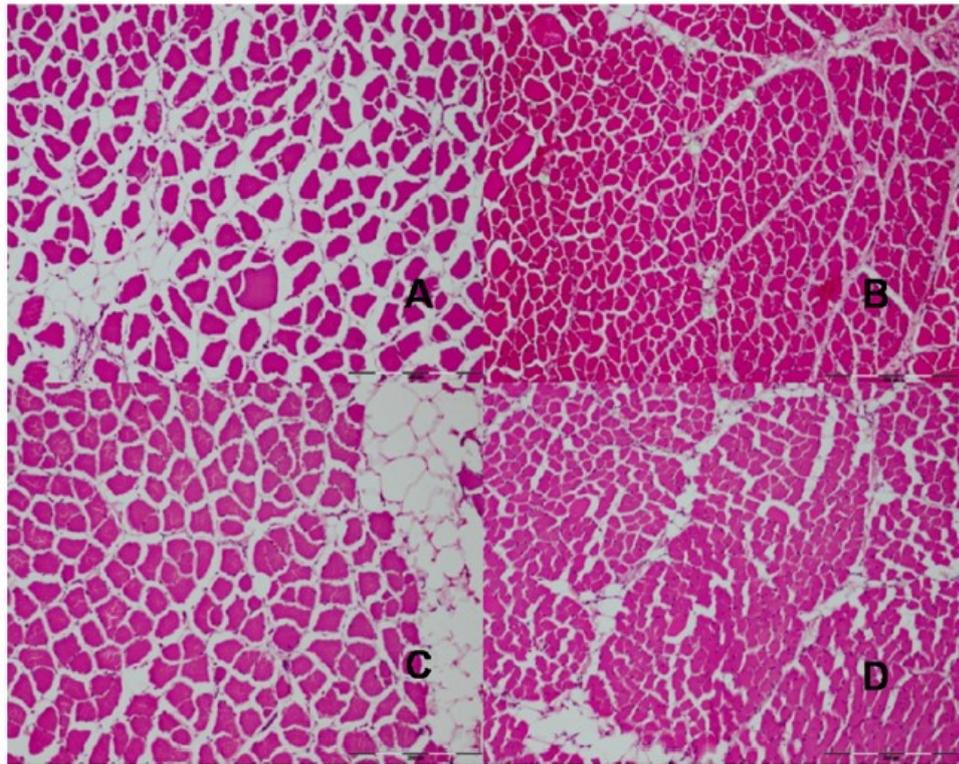
Como se ha mencionada anteriormente, el consumidor busca ciertas cualidades en los productos alimenticios. Dichas cualidades hacen referencia al origen de la especie, salvaje o de crianza, el olor y el sabor del género, el precio, la textura, entre otras; otorgando, todas ellas, calidad a los productos alimenticios o lo que es lo mismo, un valor añadido. Como se ha citado anteriormente, el colágeno es un componente mayoritario en el tejido conectivo intramuscular y responsable en gran medida de la textura del filete en peces (apartado 1.4). Esto se debe a que dicha molécula envuelve las fibras musculares, dotando al cuerpo de integridad y firmeza, siendo dicha molécula clave para conseguir una mejor textura en los filetes de pescado (Bremner y Hallett, 1985; Sato *et al.*, 1986; Love, 1988; Ando *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la mayor concentración de colágeno se encuentra en las miocomatas, las cuales separan el cuerpo en segmentos, los miotomos. Por otro lado, también se han encontrado láminas de esta molécula rodeando a las fibras musculares, conocido como endomisio, así como envolviendo al conjunto de las fibras musculares, nombrado como perimisio (Bremner y Hallett, 1985). La firmeza, o textura, otorgada por el colágeno en los filetes de pescado es un parámetro de calidad crítico, mediante el cual un producto puede ser rechazado o aceptado (Veland y Torrissen, 1999). Dicho parámetro de calidad, también sirve como un índice de frescura de los productos de acuicultura, pudiendo catalogarlos como más o menos degradados (Suárez *et al.*, 2002, 2006). Dentro de la degradación

del pescado para consumo humano, existen diferentes factores que alteran la calidad del producto. Dichos factores son variados, el origen (salvaje o crianza), edad, tasa de crecimiento, inanición, dieta, las condiciones de cultivo como son el pH, el estrés y la temperatura a la que se crían los organismos son unos de ellos. El efecto de las estaciones y del esfuerzo físico de los peces también tiene sus efectos en la textura del filete, así como la composición química, la celularidad del músculo y el contenido en colágeno. Los cambios en la textura tras el almacenamiento en frío, así como tras el cocinado de los filetes, también han sido estudiados. Todos estos factores se ha visto que tienen su efecto en la calidad del filete, sin embargo su efecto no es igual para especies distintas. Además dentro de la misma especie, el tamaño del pescado también crea diferencias en la textura del filete. (Ginés *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2006; Hagen *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2007).

Se ha constatado la existencia de una tendencia en el aumento de la fuerza de ruptura a medida que aumenta el peso en matrinxã o jatuarana (*Brycon cephalus*) en un estado juvenil. Sin embargo en organismos adultos, el colágeno de la miocomata es más débil y presenta menos enlaces cruzados que el colágeno en peces más jóvenes (Suárez *et al.*, 2006).

Es destacable un trabajo en el cual se hacen comparaciones de la textura en función del origen del pescado. Comprobando que organismos de la especie besugo del Cantábrico (*Pagellus bogaveo*) de origen salvaje presentan una mayor cantidad de colágeno, con la consecuente mejora de la textura (Figura 8). También cabe destacar que presentan un mejor aroma y sabor los organismos de origen salvaje. Sin embargo, las concentraciones en aceites esenciales para la dieta humana, como son el EPA y ácidos grasos insaturados de cadena larga (HUFA), fueron mayores para los peces cultivados (Rincón *et al.*, 2016). Esta mejora de la textura puede ser debida en parte a la mayor presencia de fibras musculares de músculo rojo en los peces salvajes (Figura 9).

Por lo que respecta al efecto de la temperatura de cultivo, se ha observado que filetes de salvelinos (*Salvelinus alpinus*) cultivados a 10 °C, presentan una menor firmeza y son menos elásticos que los filetes de los criados a 15 °C. Por ello se pueden apreciar mejoras en la mayoría de las categorías de textura de los filetes crudos en individuos cultivados a mayor temperatura, independientemente de la variedad dentro de la especie (Ginés *et al.*, 2004).



*Figura 8:* Cantidad de fibras de músculo rojo de dos porciones de distintas zonas del besugo del Cantábrico. Tinción Haematoxilina–eosina, 10×. (A) Músculo rojo zona craneal de acuicultura, (B) músculo rojo zona craneal de pesca extractiva, (C) músculo rojo zona caudal de acuicultura y (D) músculo rojo zona caudal de pesca extractiva (Rincón *et al.*, 2016).

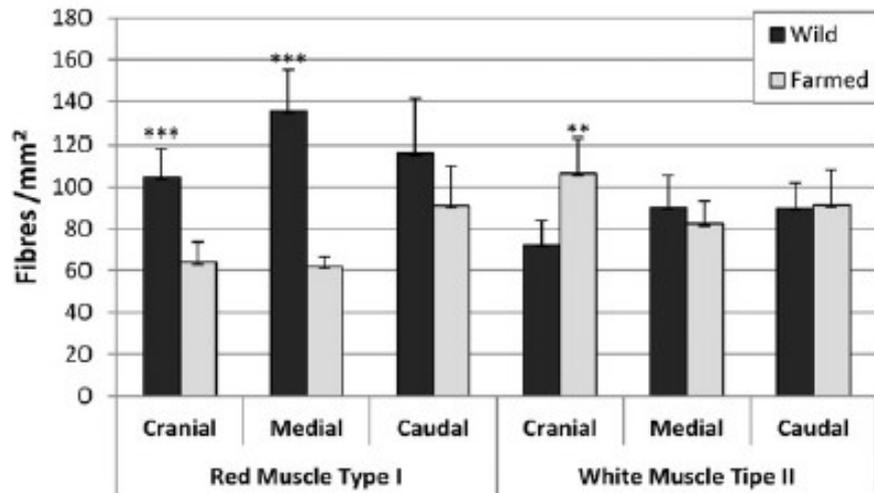


Figura 9: Comparación de fibras musculares blancas y rojas, en diferentes partes del filete, entre besugo del Cantábrico de pesca extractiva frente al de acuicultura (Rincón *et al.*, 2016).

Por otro lado, en una experiencia realizada con truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), se pudo apreciar como la alimentación con dietas ricas en grasas, provocó que los filetes presentasen menos resistencia a la compresión, por lo que dietas ricas en grasa parece ser que provocan una disminución de la textura de los filetes (Andersen *et al.*, 1997) (Figura 10).

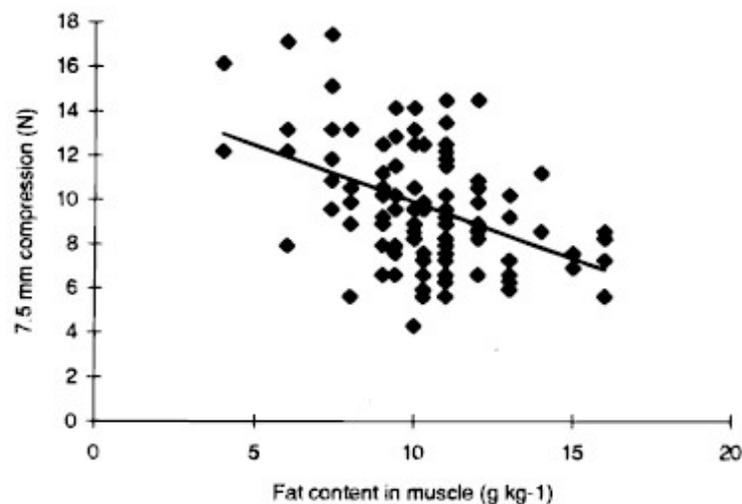


Figura 10: Gráfica en la que se representa como a mayor contenido en grasa en el músculo ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) la fuerza de compresión de 7,5 mm (N) realizada con el texturómetro fue menor (Andersen *et al.*, 1997).

Son varios los estudios sobre el efecto del almacenamiento en frío de los filetes de pescado (Andersen *et al.*, 1997; Suárez *et al.*, 2006, 2007; Caballero *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2015). Se

ha demostrado, según Suárez y colaboradores (2006), que el almacenamiento en frío, a  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas provoca una degradación del tejido conectivo pericelular en los filetes de pescado (Tabla III). Por otro lado, en un trabajo en dorada (*Sparus aurata*) (Caballero *et al.*, 2009), se ha encontrado que los parámetros con que se mide la textura, concretamente la dureza y la fracturabilidad, reflejan claramente los cambios que sufre el músculo durante su almacenamiento en frío (Figura 11).

Tabla III: Valores de fuerza de ruptura de los filetes (Suárez *et al.*, 2006).

Fuerza de ruptura (g)	Peso de los peces		
	120	230	350
Antes de la súper refrigeración	211,8 ± 16,9 <sup>a</sup>	196,4 ± 6,8 <sup>a</sup>	242,3 ± 23,5 <sup>a</sup>
Después de la súper refrigeración	116,5 ± 11,5 <sup>b</sup>	83,0 ± 2,1 <sup>b</sup>	102,1 ± 6,5 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes, indican diferencia estadística ( $P < 0,001$ ), tanto para columnas como para líneas.

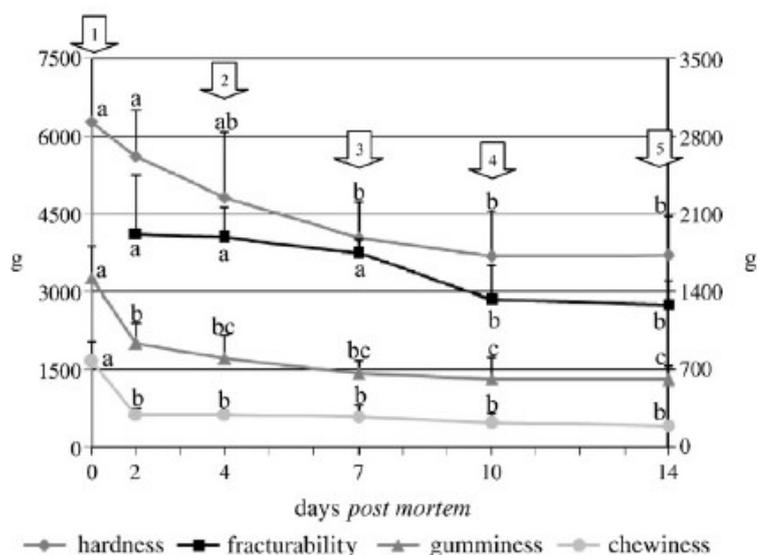


Figura 11: Modificación de los distintos parámetros correspondientes con la textura en dorada (hardness=dureza, fracturability=fracturabilidad, gumminess=gomosidad, chewiness=masticabilidad), en función del tiempo transcurrido tras su muerte y almacenado en frío (Caballero *et al.*, 2009).

La pérdida de calidad de los filetes de pescado durante el almacenamiento es debida a la acción enzimática degradativa que tiene lugar en el músculo. Dicha degradación se centra en la distrofina, alterando de esta forma las uniones entre las proteínas musculares y el tejido conectivo (Caballero *et al.*, 2009). Las uniones existentes entre el colágeno y las células musculares son responsables en gran medida de la compactación del filete y consecuentemente de su textura. De hecho, se ha observado que la cantidad de enlaces cruzados hydroxylisil piridinolina (PYD) presentes en el músculo son determinantes en lo que a propiedades de la textura se refiere, tanto en productos frescos como ahumados (Li *et al.*, 2005; Hagen *et al.*, 2007). En fletán Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) se constató que los enlaces cruzados del colágeno son un factor más explicativo de la firmeza de lo que lo es la densidad de las fibras musculares, teniendo importantes efectos en estas características dependiendo de la estación. Así, los organismos analizados en invierno son los más firmes debido a que el crecimiento se detiene y la fracción de Hyp alcalina insoluble incrementa por los enlaces cruzados PYD. Cabe destacar que en primavera los datos de textura son más elevados, sin embargo el gasto de energía durante los meses de invierno y la pérdida de biomasa debido a la maduración conllevan a una deficiencia en la calidad del producto, siendo un otoño tardío o un invierno temprano la etapa donde los peces presentan mejor estado nutricional y unas buenas texturas (Hagen *et al.*, 2006; 2007).

Es destacable la demostración de que las diferencias en el contenido de colágeno pueden explicar la variación en la textura del filete crudo, así como que el diámetro de las fibras del músculo puede demostrar las diferencias en textura en el filete cocinado (Ginés *et al.*, 2004). Se han realizado estudios de la textura de distintas especies, en relación a la importancia del tejido conectivo sobre esta característica. Por un lado, en lo que se refiere al filete crudo, se valoraron los niveles de dureza para *Limanda yokohamae*, *Sebastes macrochir*, *Exocoetide sp.*, *Katsuwonus pelamis* y *Trachurus japonicus*, siendo el orden decreciente en la dureza. Sin embargo las durezas de los filetes cocinados siguieron el un orden descendente distinto; *K. pelamis*, *E. sp.*, *T. japonicus*, *L. yokohamae* y *S. macrochir*. La mayor firmeza, en el filete crudo, se atribuyó a la

mayor cantidad de colágeno, siendo otras características asociadas a las fibras musculares responsables de la dureza del filete cocinado (Hatae *et al.*, 1986).

En lo que se refiere al cultivo de forma intensiva o extensiva, se han realizado comparaciones en perca euroasiática (*Perca fluviatilis* L.) de talla comercial (120-150 g) y cultivados de manera extensiva e intensiva. En dichas comparaciones, los valores de dureza, elasticidad, cohesividad y gomosidad fueron mayores para los organismos cultivados de manera extensiva, cabe destacar que también encontraron diferencias en los contenidos de ácidos grasos (Stejskal *et al.*, 2011).

Analizando los distintos trabajos realizados, es evidente que los peces salvajes presentan cualidades en la calidad del filete diferentes que los criados en cautividad. Sin embargo, es necesario conocer los efectos en los organismos en distintas condiciones de cultivo, así como en diferentes especies. Se ha comprobado que las condiciones de crianza de los peces conllevan a variaciones en el producto final, afectando a la calidad del filete (Izquierdo *et al.*, 2003). Estas variaciones se atribuyen a las condiciones de crianza, las cuales pueden ser registradas por evaluaciones sensoriales incluyendo atributos relacionados con la textura y el sabor del filete (Grigorakis *et al.*, 2003; Olsson *et al.*, 2003; Sveinsdóttir *et al.*, 2009).

## 2. Objetivos

El objetivo global que se persigue con este trabajo es mejorar la calidad final del filete de lubina de crianza a través de la inclusión de hidroxiprolina en dietas de finalización. Tanto el aminoácido de elección como los niveles de inclusión a proponer han de estar acordes con su posible transferencia a escala industrial, fundamentalmente en lo que se refiere a la limitación de costes de fabricación del pienso. Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- Evaluar el efecto de la inclusión de hidroxiprolina sobre la ingesta, los rendimientos productivos y la composición química del filete.
- Determinar posibles cambios en la textura instrumental motivados por el aporte de hidroxiprolina tanto en el pez entero como en los filetes crudos y cocinados.
- Estudiar la estructura de colágeno a nivel muscular y la influencia de los distintos aportes de hidroxiprolina sobre su distribución y extensión.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Peces usados y acondicionamiento

El experimento se llevó a cabo en las Instalaciones de Acuicultura de la Fundación Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Se usaron 12 tanques de 1000 l dotados de aireadores y con flujo continuo de agua de mar suficiente para garantizar una renovación por hora (0,27 L/s). Un total de 300 lubinas con un peso de  $609,21 \pm 75,39$  g fueron repartidas al azar a razón de 25 peces por tanque. Previo dicho reparto, los peces fueron aclimatados a las instalaciones durante un mes en tanques de 10000 L ya que provenían de jaulas de engorde en mar abierto. Los animales fueron proporcionados por la empresa Alevines y Doradas S.A. (ADSA, Gran Canaria, España).

#### 3.2. Dietas empleadas

Para la alimentación de las lubinas se emplearon cuatro dietas distintas, una por cada tres tanques. Dichas dietas, de un diámetro 3 mm fueron; una dieta control (dieta C) basada en una composición estándar de engorde, suministrada por la empresa Dibaq (Segovia, España) y tres dietas suplementadas con distintas concentraciones de hidroxiprolina; 0,6 (dieta HL), 1,2 (dieta HM), y 2 % (dieta HH). El pienso se distribuyó en dos tomas, a las 8:30 h y a las 14:30 h, hasta saciedad aparente, a lo largo de 143 días (5,5 meses). Los ingredientes utilizados para la formulación así como la cantidad incluida se presentan en la Tabla IV.

#### 3.3. Análisis bioquímico de las dietas

Para la realización del perfil de ácidos grasos hubo que realizar previamente una extracción de lípidos totales, para de esta manera realizar la metilación necesaria para el perfil de ácidos grasos. La extracción de lípidos totales se realizó mediante el método de Folch (Folch *et al*, 1957). Dicho método consistió en poner una pequeña dosis de muestra conocida en un tubo A y añadirle 5 ml

de Cloroformo:Metano (2:1) con 0,01 BHT. Dicha mezcla se homogeneizó en ultra turrax, durante unos segundos, con el tubo introducido en hielo picado para evitar su calentamiento y la pérdida de muestra por oxidación (Figura 12.1). Tras cada homogeneización se limpió el vástago con 5 ml del mismo solvente usado, cayendo dicho volumen en el mismo tubo con la muestra. Así mismo, se retiraron con pinzas los restos de muestra que pudiesen quedar en el ultra turrax, estos restos se introdujeron en el tubo correspondiente. Tras esta limpieza, se añadieron 2 ml de KCl 0,88 % y se centrifugó, durante 5 minutos, a 2000 r.p.m. (este tiempo y r.p.m. fueron iguales para todas las centrifugaciones realizadas), obteniendo de esta forma dos fases; una superior con la sal y el metanol y una inferior que contenía lípidos y cloroformo. La fase superior se desechó y con la fase inferior se procedió de la siguiente forma; en un segundo tubo (previamente pesado) se filtró dicha fase, mediante un papel de filtro con una punta de sodio sulfato anhidro (Figura 12.3). Antes y después de filtrar los lípidos, se empapó el filtro con triclorometano para evitar que quedasen retenidos los ácidos grasos. Tras evaporar el contenido de este segundo tubo, mediante N<sub>2</sub> y una manta calefactora (Figura 12.4), se obtuvieron los lípidos de la muestra (la evaporación se realizó siempre de la misma manera).

Tabla IV: Ingredientes utilizados para la formulación de las dietas experimentales.

ingredientes (g/kg de pienso)	dietas			
	C	HL	HM	HH
harina de pescado	230	227	224	220
harina de soja	260	257	254	250
harina de sangre	50	50	50	50
gluten de maíz	160	160	160	160
harina de trigo	170	170	170	170
aceite de pescado	60	60	60	60
aceite de soja	60	60	60	60
premix	10	10	10	10
hidroxipropilina	--	6	12	20

El tubo con los restos de la evaporación se pesó y se calculó la diferencia de peso entre este peso y el inicial, obtenido de esta forma el contenido total de lípidos. Con dichos lípidos, se pudo pasar

a la metodología para la determinación de ácidos grasos, en concreto la descrita por Christie (1993), así como su identificación y cuantificación mediante cromatografía de gases bajo las condiciones descritas por Izquierdo *et al.* (1992). El procedimiento empleado es el que sigue, al tubo con los lípidos totales se le añadió 1 ml de Tolueno con BHT (50 gm/L) y 2 ml de Metanol:Sulfúrico al 1%. Dicho tubo se llenó con N<sub>2</sub>, se selló y agitó fuertemente, para posteriormente incubarlo, durante 16 horas, a 50 °C en una manta calefactora en oscuridad. Trascurrido el tiempo de incubación se dejó enfriar y se añadió 3,5 ml de agua ultrapura y 4 ml de Hexano:Dietil Éter 1:1 con BHT al 0,01%, se agitó y se llevó a la centrifuga (Figura 12.2). Pasado dicho tiempo, se pasó la fase superior a un tercer tubo y se le añadió al segundo 4 ml de Hexano:Dietil Éter 1:1 sin BHT y se volvió a centrifugar. Finalizada la centrifugación, se pasó la fase superior al tercer tubo ya mencionado y se le añadió a este 3 ml de KHCO<sub>3</sub> al 2 %, se agitó y se llevó a la centrifuga. Concluida esta última centrifugación, se transfirió la fase superior a un tercer tubo (previamente pesado) y se evaporó, dicha evaporación no fue a sequedad. Mientras la evaporación iba produciéndose se preparó la cámara de vacío (Figura 12.5), donde se colocaron los cartuchos NH<sub>2</sub> del Sep-pak Vac RC (500 mg). Cuando se evaporó gran cantidad del contenido del tercer tubo, se disolvieron los ésteres metilados de los ácidos grasos (FAMES) con 2ml de Hexano HPLC y también se empaparon los cartuchos NH<sub>2</sub> con el mismo volumen de Hexano HPLC para activar el filtro. Se activó el vacío, se abrió la llave y el Hexano cayó gota a gota en el tubo dispuesto justo debajo del cartucho. Una vez que todo el Hexano pasó al tubo de residuos, se quitó el vacío y cerró la llave, de esta manera se pusieron los FAMES en el cartucho sin que se perdieran por gravedad. El mismo tubo de los FAMES se colocó debajo del cartucho correspondiente, se activó el vacío y se abrió la llave; fluyendo gota a gota los FAMES de la muestra. Posteriormente se añadió 4 ml de Hexano con el fin de que los ácidos grasos no quedasen retenidos en el cartucho. El tubo con los FAMES se evaporó a sequedad (Figura 12.6), se pesó y se diluyó a concentración de 40 mg de FAMES por ml de Hexano. El volumen final de esta dilución se introdujo en un vial con septum y tapa (Figura 12.7). La identificación de los ácidos

grasos presentes en el vial, se realizó mediante el cromatografía de gases, con el uso del cromatografo de gases Thermo electron corporation GC. Focus serie, Milán (Italia).



Figura 12: Metodología para la cuantificación del contenido en lípidos y ácidos grasos. 1, 2, 3 y 4 (pasos y aparatos de la extracción de lípidos), 5, 6 y 7 (metilación para determinar los FAMES).

Para la determinación de la humedad se utilizaron pesafiltros y sus tapas (Figura 13), los cuales estuvieron, durante una hora, en la estufa a  $110^{\circ}\text{C}$  destapados. Transcurrido dicho tiempo se taparon y se dejaron enfriar en un desecador durante media hora, para tomar el peso a temperatura ambiente (peso A). Tras la anotación de este peso, se le añadió una dosis de muestra de más de un gramo y se anotó el peso en conjunto (peso B). Este conjunto de muestra y pesafiltros se llevaron a la estufa destapados y no se sacaron hasta transcurrido un día. Pasado dicho tiempo se taparon y se dejaron enfriar en un desecador durante media hora, para posteriormente anotar el peso del conjunto. Se volvió a secar los pesafiltros destapados en la estufa durante dos horas hasta conseguir que el peso fuera igual o mayor a la última anotación de peso realizada (a dicho peso final se le llamo C). Tras conseguir dichos pesos, solo hubo que

aplicar la próxima fórmula, para determinar el porcentaje de humedad de las dietas utilizadas; %

$$\text{Humedad} = 100 \cdot (B-C)/(B-A).$$



Figura 13: Pesafiltros utilizados para determinación de la humedad en las dietas.

Por otro lado, también se determinó el nivel de proteínas en las distintas dietas según la técnica de Kjeldahl (AOAC, 1980). Para realizar esta técnica primeramente se etiquetaron tres tubos de digestión de 200 ml para cada dieta más un blanco, dando un total de 13 tubos. A cada uno de los tubos se le introdujo un catalizador de cobre y selenio, con el fin de acelerar la digestión de la muestra (Figura 14.1), así como una dosis de unos 200 g (peso exacto anotado en estadillo) (Figura 14.3) de las dietas bien homogeneizadas con la ayuda un picador de cocina (Figura 14.2). Las muestras pesadas se depositaron en sus respectivos tubos (Figura 14.4) y se le añadió 10 ml de ácido sulfúrico. Con los tubos preparados se introdujeron en un digester de proteínas, durante una hora a 400 °C y transcurrido este tiempo se les dejó enfriar durante media hora (Figuras 14.5 y 14.7). Durante este proceso todo el nitrógeno presente se convirtió en sulfato de amonio

((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Una vez que los tubos estuvieron fríos, se le añadió a cada uno 20 ml de agua destilada y se pasaron por el vortex, con el fin de homogeneizar la muestra. Por otro lado, en 13 matraces Erlenmeyer (uno por cada tubo de digestión) se pusieron 30 ml de ácido bórico saturado y 10 gotas de indicador mixto 4,8 (Rojo de Metilo-Verde de Bromocresol), como se aprecia en la Figura 14.8. Tras estas preparaciones, se introdujeron cada tubo más su correspondiente Erlenmeyer en un destilador Kjeltect™ 2100 de la marca FOSS, donde se liberó el amoníaco (NH<sub>3</sub>) añadiendo sosa (NaOH) en exceso (Figura 14.9). Por último se determinó el NH<sub>3</sub> liberado mediante una valoración con ácido clorhídrico (HCl), como se aprecia en la Figura 14.6. Con el volumen usado para producir el viraje de color en el matraz Erlenmeyer se calculó el % proteína presente en las dietas, mediante la fórmula de la Figura 14.10.



Figura 14: Metodología para la determinación de proteínas. 1 (catalizador de cobre y selenio), 2 (picador de cocina), 3 (anotación de pesos analizados), 4 (incorporación de las dietas pesadas en los respectivos tubos), 5 (digestión ácida), 6 (valoración ácido clorhídrico), 7 (enfriamiento tras las digestión ácida), 8 (incorporación de ácido bórico e indicador mixto 4,8), 9 (destilador Kjeltect™ 2100 de la marca FOSS) y 10 (fórmula de % de proteína).

La composición proximal y el perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales se presentan en la Tabla V.

Tabla V: Composición proximal (%) y perfil de ácidos grasos (g/100 g de grasa) de las dietas experimentales.

composición proximal	dietas			
	C	HL	HM	HH
proteína bruta	42,49	45,15	45,97	46,89
grasa bruta	20,07	19,39	18,03	18,16
humedad	6,44	6,35	6,70	6,44
cenizas	8,35	8,42	8,35	8,54
ácidos grasos				
Σ saturados	23,60	24,49	22,42	22,16
Σ monoinsaturados	49,58	50,86	47,05	47,19
Σ n-3	8,25	6,58	10,37	10,58
Σ n-6	17,85	17,39	19,42	19,26
Σ n-3 cadena larga	4,30	3,21	5,80	5,97
n-3/n-6	0,46	0,38	0,53	0,55

### 3.4. Seguimiento de parámetros de cultivo

Para el control sobre el experimento, se tomaron mediciones de oxígeno disuelto, así como la temperatura de los tanques, dos veces por semana durante el período de engorde, con la ayuda de un oxímetro (Figura 15). La evolución de la temperatura y del oxígeno disuelto en los tanques, a lo largo del experimento, se puede apreciar en la figura 16 y figura 17 respectivamente. Se puede apreciar como la temperatura varía a lo largo de la experiencia de engorde realizada con las lubinas, presentando máximos durante los meses de septiembre y octubre, y decayendo en los últimos meses de experiencia. Por otro lado, en lo que se refiere a la concentración de oxígeno sigue un patrón inverso a la temperatura, obteniendo mínimos durante el mes de septiembre y valores más elevados durante los meses previos a la conclusión del experimento. La iluminación siguió el ritmo de fotoperiodo natural (28° 10' N).

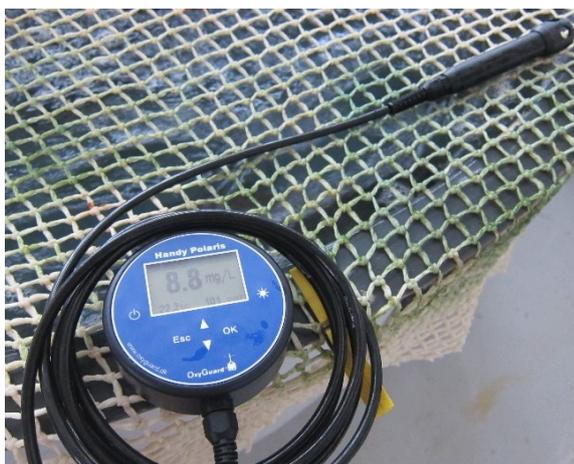


Figura 15: Oxímetro. La temperatura es medida en °C y la concentración de oxígeno en mg/L.

Figura 16: Evolución de la temperatura a lo largo del experimento.

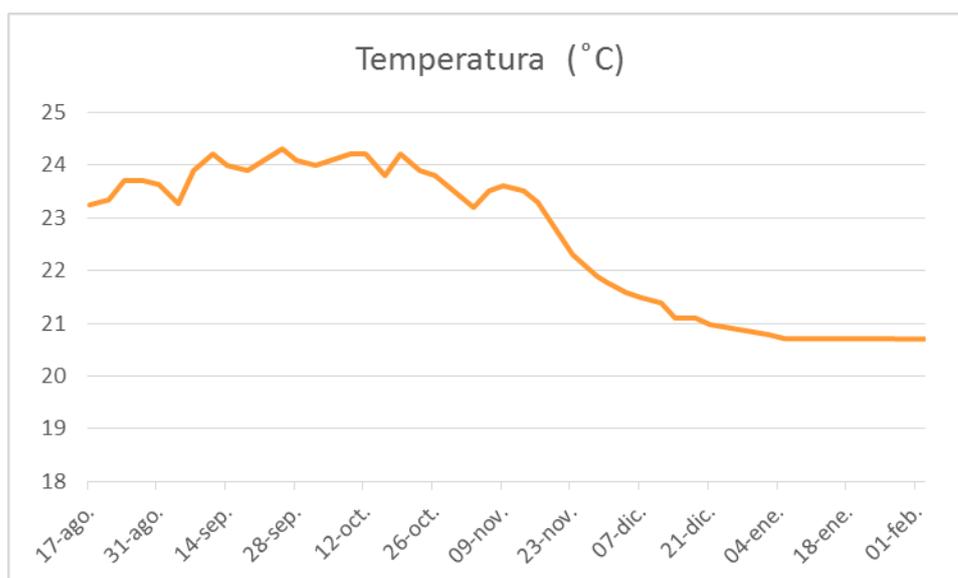
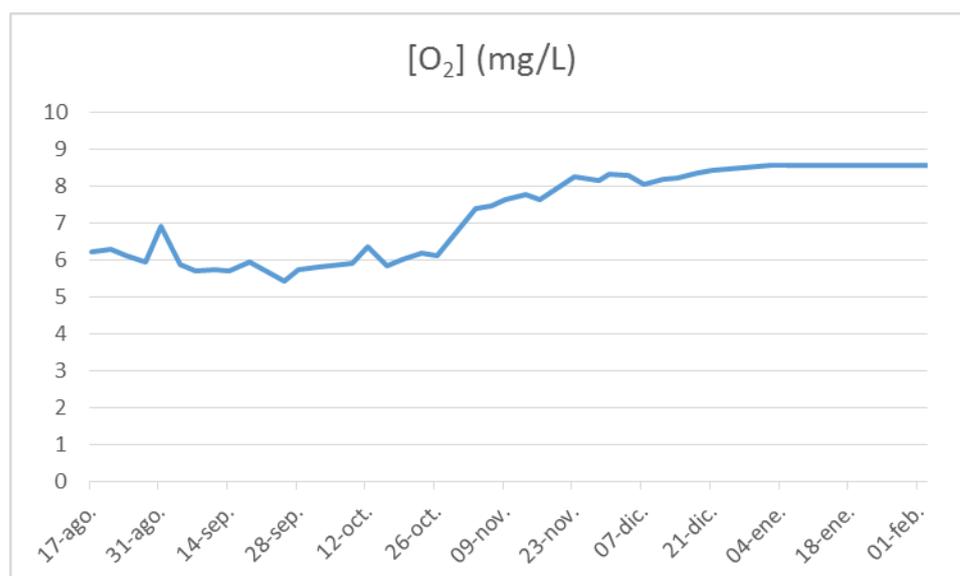


Figura 17: Evolución de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del experimento.



### 3.5. Muestras realizadas

Durante la duración de esta investigación se llevó a cabo un control del peso que fueron ganando los peces, se tomaron medidas de peso al principio del experimento, a los 45, a los 99 y a los 143 días. En la Figura 18 se muestra la metodología empleada en los muestreos de las lubinas. Como se puede ver en la Figura 18.3, previo al muestreo se redujo el nivel de los tanques a más de la mitad. Para poder manejar adecuadamente a los individuos, se vertieron 5 ml de aceite de clavo (en una proporción de 50% etanol al 96% y otro 50% de esencia de clavo), de esta manera se redujo la actividad de los peces evitando posibles lesiones. Una vez que el anestésico hizo efecto en los peces, estos se pescaron con jamos y fueron depositados en otro tanque de 160 l con aireación y 8 ml de anestésico para completar el aturdimiento y poder pesarlos fácilmente (Figura 18.2). Tras ello fueron depositados en un tanque de recuperación (Figura 18.1), con renovación y aireación, para posteriormente devolverlos a sus respectivos tanques tras una preveía limpieza y desinfección.

De cada tanque, fueron sacrificadas 5 lubinas, las cuales fueron sumergidas en agua con hielo, para provocar la muerte por hipotermia. Cada grupo de lubinas sacrificadas se introdujeron en

bolsas etiquetadas (Figura 18.4) para su posterior procesamiento en las instalaciones del SABLE (Servicio de Acuicultura y Biotecnología de Alta Especialización), tal y como se aprecia en la Figura 19. Los peces sacrificados fueron procesados en la misma nave, en el laboratorio anexo, el cual se organizó para la toma de muestras (Figura 19.1). Primeramente se pesaron (Figura 19.2), siguiendo un orden para evitar confusiones a la hora de etiquetar las distintas muestras y de realizar las mediciones posteriores (Figuras 19.5, 19.8 y 19.9). Tras la toma de peso y de la medición realizada de la textura del pez entero (detallado en el apartado textura), se procedió a extraer un pequeño trozo del músculo (mediante un corte) en la parte posterior de la aleta dorsal (Figura 19.3), el cual se introdujo en un bote con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, con una concentración final de 0,113 M (Figura 19.9), para conservarlo y tratarlo posteriormente (en el apartado histología se detalla este tratamiento). De cada pez, se extrajeron dos filetes (Figuras 19.4 y 19.6), tanto del izquierdo como del derecho se emplearon pequeños trozos para determinaciones de textura en crudo y cocinado. Por otro lado, las partes restantes de los filetes se emplearon para realizar analíticas de bioquímica, siendo necesario la eliminación de la piel y de escamas (Figura 19.7) y su posterior etiquetado en bolsas (Figura 19.8).

Con los datos obtenidos de peso y alimentación se calcularon distintos parámetros para conocer la evolución que siguieron las lubinas durante la experiencia. Se calculó el consumo medio diario (CMD) por tratamiento en los distintos periodos que duró el experimento en función de la siguiente fórmula:

$$\text{CMD} = \Sigma \text{alimento aportado a lo largo de un periodo (g) / días que duró el periodo}$$

Por otro lado, también se calculó el índice de conversión del alimento (FCR) por dieta empleada, durante las distintas etapas que tuvieron lugar a lo largo de la investigación. Dicho índice se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{FCR} = \text{alimento consumido (g) / peso ganado (g)}$$

También se calculó la tasa de crecimiento estándar (SGR) con los diferentes tratamientos empleados, durante los distintos periodos. Este índice se calculó a partir de la fórmula que sigue:

$$\text{SGR} = (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días} * 100$$



Figura 18: Muestras de peso. 1 (tanque de recuperación), 2 (toma de pesos de los organismos), 3 (vaciado de los tanques) y 4 (empaquetado de los organismo sacrificados).



Figura 19: Toma de muestras. 1 (material de disección), 2 (toma de peso de lubinas sacrificadas), 3, 4 y 6 (extracción de muestras), 5, 8 y 9 (etiquetado de muestras) y 7 (limpieza de las muestras).

### 3.6. Textura

En cada pez se tomaron distintas medidas de textura, una del pez entero, otra del filete en crudo y una tercera del filete cocinado. De los filetes izquierdos se extrajeron tres pequeñas porciones de músculo (Figura 20.3), con las cuales se realizaron mediciones de textura en crudo (Figura 20.4), dichas porciones fueron cuadradas, de unas medidas de 2x2 cm. Por otro lado, de los filetes derechos también se tomaron dos porciones (de las mismas proporciones que para crudo), las cuales tuvieron un tiempo de cocinado de diez minutos, en un horno de convección a 105 °C, con el fin de medir las texturas del músculo tras el cocinado (Figura 20.5). Las porciones cocinadas a las cuales no se les realizaron el análisis de textura en el momento que salieron del horno, fueron almacenadas en mantenedores de calor, a una temperatura de 65 °C. Las mediciones de textura fueron realizadas con el texturómetro Stable Micro Systems TA.XT2 (Surrey, Inglaterra) (Figura 20.1), determinándose el correspondiente Texture Profile Analysis (TPA). Se utilizó un plato de aluminio de 100 mm de diámetro para realizar la compresión de las porciones extraídas de los filetes (Figura 20.4), así como una velocidad de empuje de 0.8 mm/s hasta alcanzar una deformidad del 60% para las piezas crudas y del 80% para las cocinadas, comprimiendo las porciones dos veces en un intervalo de 30 segundos. Por otro lado, para las mediciones de peces enteros, se empleó una probeta de 12 mm de diámetro (Figura 20.2), a una velocidad cruceta de 5 mm/s hasta deformar la pieza un total de 7 mm, comprimiendo los pescados dos veces, en un intervalo de 5 segundos (Ginés *et al.*, 2004). Con dichos análisis, se obtuvieron unas gráficas, las cuales se tuvieron que integrar para poder determinar las distintas propiedades del filete. Dichas características del filete fueron: fracturabilidad, dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad, adhesividad y resistencia. La gráfica proporcionada por el texturómetro, así como los distintos parámetros que de ella se obtienen tras su integración, se describen en la Figura 21.



Figura 20: Texturómetro y toma de texturas. 1 (texturómetro), 2 (toma de textura pez entero), 3 (porciones filete crudas), 4 (toma de textura del filete en crudo), 5 (porciones del filete cocinadas) y 6 (toma de textura del filete cocinado).

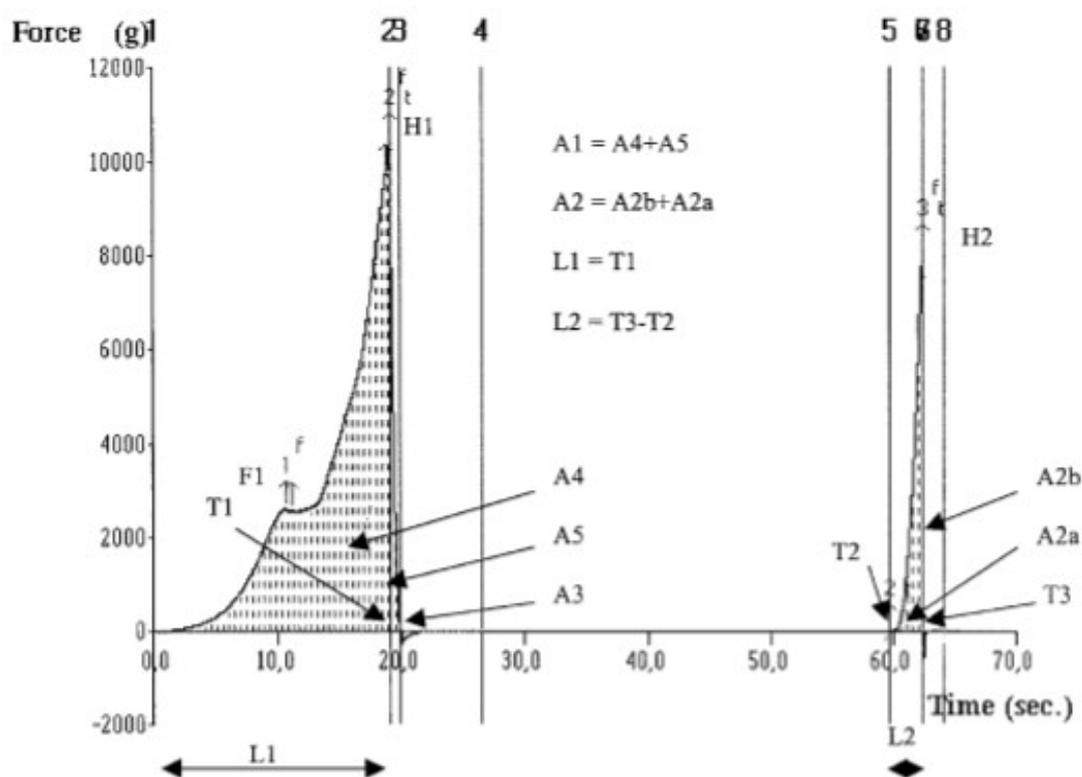


Figura 21: Gráfica de textura y cálculos necesarios para los parámetros obtenidos de la medición. Capacidad de fracturar = Force 1 (F1), Dureza = Force 2 (F2), Elasticidad = (Time 3 – Time 2)/Time1, (L2/L1), Cohesión = (Area 5:6 + Area 6:7)/( Area 1:2 + Area 2:3), (A1/A2), Gomosidad = Force 2\*[(Area 5:6 + Area 6:7)/(Area 1:2 + Area 2:3)], [H1\*(A1/A2)], Masticabilidad = Force 2\*[(Area 1:2 + Area 2:3)/(Area 5:6 + Area 6:7)]\*[(Time 3 – Time 2)/Time 1], [H1\*(A1/A2)\*L2/L1], Adhesividad = Area 3:4, (A3), Resistencia = Area 2:3/Area 1:2, (A5/A4) (Ginés *et al.*, 2004).

### 3.7. Análisis bioquímico del filete

Con los filetes obtenidos, durante los sacrificios de las lubinas, se realizaron medidas de contenido de colágeno, lípidos y proteínas totales así como la humedad, mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (Near-infrared spectroscopy, NIRs) FoodScan™ (FOSS, Hillerød, Dinamarca). El aparato cuantifica los compuestos que contengan agrupaciones funcionales con hidrógenos unidos a carbonos, nitrógenos y oxígenos, dando así un análisis de los resultados de forma directa: se emite un haz de luz que, al interactuar con material biológico, produce una radiación electromagnética en forma de ondas en el rango de los 750 a los 2.600 nm dentro del espectro cercano al infrarrojo, que penetra a través de la superficie de la capa de partículas, excita con vibración las moléculas de analito y luego se dispersa en todas las direcciones (Ramírez-García *et al.*, 2012). De este modo, se produce un efecto de absorción o reflexión que depende de la composición de la muestra

Para poder medir estos parámetros dichas muestras necesitan una preparación, la cual se visualiza en la Figura 22. Como se aprecia en la Figura 22.1, se eliminaron en los filetes de lubina los restos de piel, escamas y espinas que pudiesen contener. Era necesario dicha eliminación debido a que estos componentes podían interferir en las mediciones realizadas por el NIR (Figura 22.5). Dicho aparato, mediante la ayuda de luz infrarroja, puede analizar la humedad, lípidos, proteínas y colágeno presentes en una muestra. Sin embargo, para un buen análisis, era necesario homogeneizar correctamente los filetes de lubina, para ello se empleó la ayuda de una picadora de cocina (Figura 22.2). Con el puré final de la homogeneización se etiquetó en las bolsas correspondientes (Figura 22.3) y se pudo realizar las mediciones oportunas con el NIR (Figura 22.5). Para introducir las muestras en el NIR se empleó placas de Petri de 55 mm a modo de recipiente (Figura 22.4), generándose la base de datos correspondiente (Figura 22.6).



Figura 22: Procesamiento de las lubinas sacrificadas. 1 (limpieza de los filetes), 2 (picadora de cocina), 3 (almacenamiento del puré de la homogeneización), 4 (placas Petri usadas para el NIR), 5 (NIR) y 6 (base de datos).

Durante la toma de medidas que se realizaron con dicho aparato hubo ciertos problemas de metodología. En un principio se analizaban las muestras por monocapa, poniendo una fina capa en la placa Petri y retirando fibras blancas que estaban presentes en el puré. Sin embargo, esta metodología proporcionaba datos erróneos, por lo que se optó por llenar las placas de Petri por completo y no se retiraron las fibras blancas, obteniendo de este modo medidas más reales.

La metodología empleada para el perfil de ácidos grasos es la misma que se empleó para las dietas (apartado 2.3). Sin embargo, en el método de Folch no se pesaron los tubos para determinar el contenido total de lípidos, ya que ese dato se obtuvo con el NIR.

Con respecto a la determinación de cenizas se empleó la metodología descrita en AOAC, 1995. Dicha determinación se realizó de la siguiente manera; los crisoles se calentaron en un horno de mufla a 110 °C, durante una noche (Figuras 23.1 y 23.2). Se dejaron enfriar en un desecador (para evitar que la humedad afectara al peso) y fueron pesados (Figura 23.3), a dicho peso se le llamó, peso A. En los mismos crisoles se pesó una dosis de muestra entre 0,5-3 g, esta medida de peso se la nombró peso B. Tras tomar dichas anotaciones, los crisoles llenados con las muestras se

llevaron a incinerar a un horno de mufla a 600 °C dejándolo toda la noche (Figura 23.4). Al día siguiente se dejaron enfriar en el desecador alrededor de una hora y posteriormente se anotó el peso, llamando a dicho peso, peso C. Tras finalizar el proceso, se aplicó la siguiente fórmula para poder determinar el porcentaje de cenizas por muestra,  $\% \text{cenizas} = 100 * (C-A)/(B-A)$ .



Figura 23: Determinación de cenizas. 1 (crisoles), 2 (estufa), 3 (desecador y balanza) y 4 (mufla 600°C).

### 3.8. Análisis histológico

Para analizar el músculo a nivel histológico, se tomaron muestras del filete del lado izquierdo al nivel de la inserción anterior de la aleta dorsal. Para preservar las muestras, se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato con una concentración final de 0,113 M (Figura 24.1). Dicho fijador es el utilizado para muestras de inmunohistoquímica, preservando la estructura antigénica del colágeno (García del Moral, 1993). Las muestras fueron limpiadas de escamas y uno de los lados fue perfilado lo más recto posible (Figura 24.2), siendo sobre ese lado donde se realizaron los cortes de 3 µm. Se introdujeron en casetes y se llevaron al procesador de tejidos (Figura 24.3), donde se sustituyó el agua tisular por parafina para solidificar el músculo y dotarlo

de la consistencia y homogeneidad adecuadas de cara a realizar los cortes con el micrótom. Tras la finalización del proceso de inclusión, se procedió a la confección de bloques de parafina (Figura 24.4), recopilando un total de 125 bloques de parafina (Figura 24.5). Una vez que los bloques solidificaron (Figura 24.6), se realizaron los siete cortes histológicos por muestra en el micrótom. Se completaron un total de 875 portaobjetos con muestras de músculo de lubina.

Cabe destacar que para ciertas tinciones realizadas (inmunohistoquímica) era necesario tratar los portaobjetos previamente, ya que al realizar las tinciones las muestras terminaban desprendiéndose. Dicho tratamiento consistió en dotar a los portaobjetos de un adhesivo. Se realizó mediante la utilización de 0,01 g de Poly-L-Lysine diluido en 100 ml de agua destilada. Los portaobjetos fueron sumergidos en esta solución durante 5 minutos y transcurrido este tiempo se bañaron en agua destilada por duplicado otros 5 minutos. Tras la finalización de los baños realizados se dejaron secar de un día para otro (Figura 24.7). Una vez que se tuvieron los portaobjetos tratados, se pudo comenzar a realizar cortes con el micrótom (Figura 24.8).



Figura 24: Procesamiento de muestras histológicas y realización de cortes histológicos. 1 (muestras fijadas), 2 (limpieza y rasurado de músculo), 3 (procesador de tejidos), 4 (realización de bloques de parafina), 5 (bloques de parafina), 6 (piramidación y eliminación de parafina sobrante), 7 (baños de Poly-L-Lysine) y 8 (realización de cortes de 3  $\mu$ m).

Entre las distintas tinciones realizadas con las muestras, una fue la de Hematoxilina-eosina, la cual se llevó a cabo en un corte de cada casete. Esta tinción consta de dos colorantes, la hematoxilina, que se une específicamente mediante puentes de hidrógeno a diversos sustratos y la eosina (colorante citoplasmático) que colorea los tejidos de diversas tonalidades entre rojo y rosa. Se suele difundir fácilmente en las estructuras hísticas, a las que tiñe debido a que, por su carácter ácido, son atraídos fuertemente hacia los radicales básicos presentes en las proteínas tisulares, como son los radicales básicos de la histidina, lisina y arginina (García del Moral, 1993). Cabe destacar que este tipo de tinción no se completó con todas las muestras (pasos de la tinción resumidos en Figura 25), ya que no era específica del colágeno, por lo que se optó por realizar las restantes tinciones.

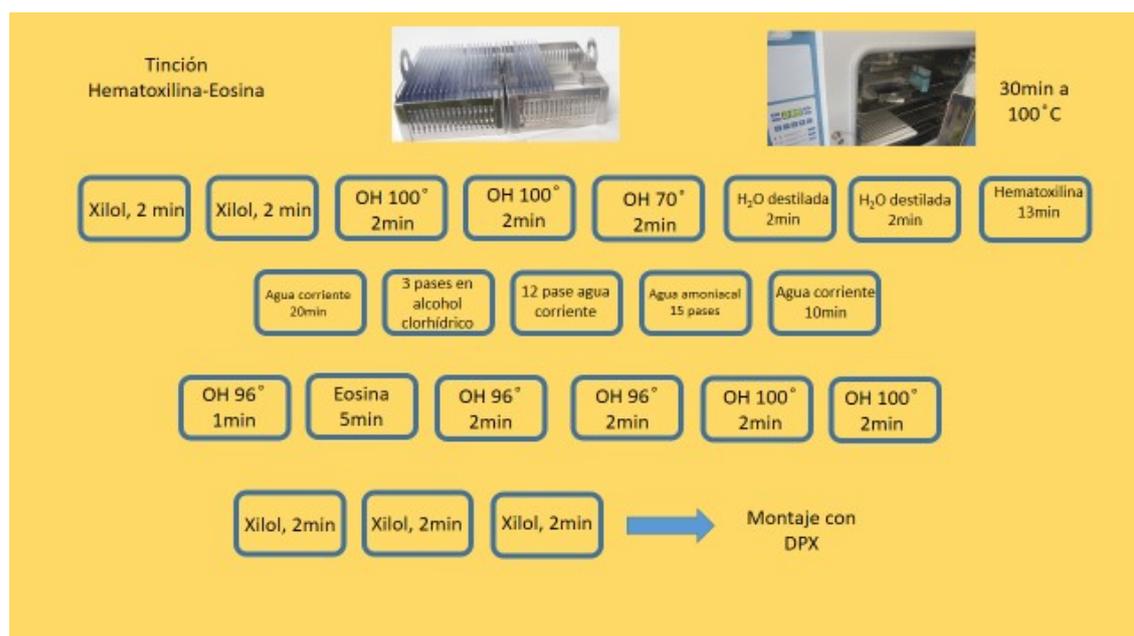


Figura 25: Tinción de Hematoxilina-Eosina.

Otra técnica de tinción empleada con un corte por casete, fue el método tricrómico de Masson mediante el azul de anilina, empleado para teñir las fibras de colágeno, con un azul intenso, el cual contrasta muy bien con la tinción del resto del músculo. Estas coloraciones tricrómicas tiñen el colágeno de tipo I, presente en los espacios extracelulares y estromas orgánicos formando gruesas fibras de colágeno. Dicha estructura posee afinidad por los colorantes ácidos debido a su

riqueza en grupos fuertemente catiónicos dependientes de los aminoácidos que componen la cadena polipeptídica (García del Moral, 1993). Cabe destacar que también se realizaron tinciones tricrómicas con la solución verde luz, sin embargo esta tinción no se completó debido a que con el azul de anilina las fibras de colágeno se apreciaban más nítidamente (Figura 26). Para dicha tinción (procedimiento esquematizado en Figura 27), tras un desparafinado e hidratación de los portas con agua destilada, las muestras fueron sumergidas en Hematoxilina de Weigert durante diez minutos. Dicho colorante consta de Hematoxilina solución A según Weigert DC y solución B. Transcurrido el tiempo en la hematoxilina, se lavó el exceso de colorante en agua corriente durante diez minutos, tras los cuales se pasó a sumergir las muestras durante cinco minutos en agua destilada. Pasados estos tiempos se introdujeron las muestras en Escarlata de Biebrich-fucsina ácida por cinco minutos, seguidamente de otra inmersión en agua destilada durante el mismo tiempo. El siguiente reactivo utilizado, con un tiempo de inmersión de quince minutos, fue el ácido fosfotúngstico al 5%, el cual se preparó a partir de cinco gramos de dicho ácido y cien mililitros de agua destilada. Transcurridos los quince minutos, las muestras se sumergieron en agua destilada por cinco minutos, para posteriormente bañarlas en azul de anilina durante quince minutos. El exceso de colorante se eliminó realizando dos inmersiones, de cinco minutos, en agua destilada, tras las cuales se sumergieron las muestras en ácido acético al 1%, durante tres minutos. Tras una última inmersión en agua destilada, de cinco minutos, se procedió a la deshidratación, aclaramiento y montaje de los portaobjetos con los cortes teñidos, con la ayuda del adhesivo DPX, medio de montaje anhidro para microscopía.

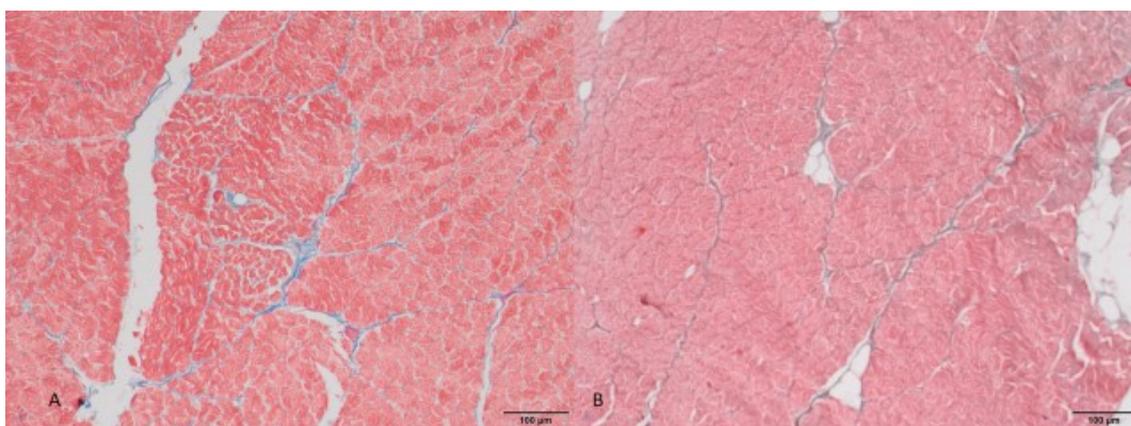


Figura 26: Comparación de las tinciones de tricrómico probadas. A (tinción tricrómico azul de anilina) y B (tinción tricrómico verde luz) 10x.

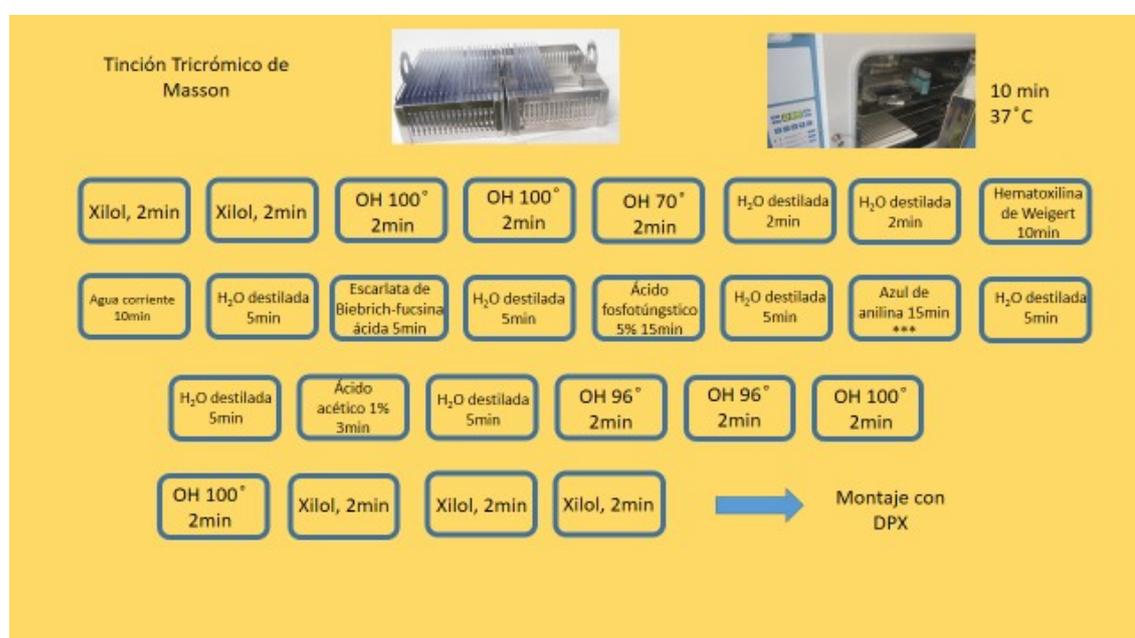


Figura 27: Tinción tricrómico de Masson. (\*\*\*, la misma tinción cambiando el azul de anilina por verde luz durante 2 minutos).

Por otro lado, se emplearon en dos cortes por pez, una técnica de inmunohistoquímica, mediante la cual unos anticuerpos específicos de los antígenos de colágeno tipo I y tipo IV (Acris GmbH (Alemania)) se unieron a las fibras de colágeno. Gracias a las tinciones que se realizaron, se pudo observar los anticuerpos teñidos, adheridos a las fibras de colágeno (pasos realizados en ambas tinciones resumidas en las Figuras 28 y 29). Para realizar dichas tinciones, las muestras tuvieron que estar a 37 °C, durante toda una noche, con la incorporación siempre de un control negativo

para verificar que la tinción se ha realizado selectivamente. Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas. Posteriormente, las muestras se introdujeron en coplins y tuvieron un baño en Target Retrieval High pH a 90 °C durante 20 minutos para la tinción del colágeno I, mientras que los portaobjetos para el colágeno IV se sumergieron en un baño de Target Retrieval Low pH durante el mismo tiempo y a la misma temperatura. Finalizado el tiempo del baño, se dejaron enfriar los coplins en hielo, hasta alcanzar unos 30 °C. Reducida la temperatura de los baños, se pasaron las muestras a una dilución de Wash buffer (1:20) durante 5 minutos, repitiendo este paso dos veces más. Seguidamente, las muestras de la tinción de colágeno IV se pasaron a una dilución de pepsina al 0,2% en 100 ml de HCl 0,01 N (1 ml HCl, 99 ml H<sub>2</sub>O y 0,2 g pepsina), durante cinco minutos, a temperatura ambiente y con pH de 2, con el fin de realizar un desenmascarado de epítomos (este paso solo se empleó con las muestras de la tinción de colágeno IV). Finalizado este baño ácido se volvió a realizar la inmersión por triplicado de la dilución de Wash buffer (1:20), antes mencionada. Finalizados los baños de Wash buffer para colágeno I y IV, se secó la parte inferior de los portaobjetos, así como los alrededores de la muestra y esta fue rodeada con un lápiz hidrófobo (Dakopen), para seguidamente colocar las muestras en una cámara húmeda con el bloqueante de peroxidasa (100 µm por portaobjetos) durante 30 minutos, con el fin de evitar falsos positivos a la hora de revelar los anticuerpos adheridos. Transcurrido el tiempo mencionado, recibió tres baños de Wash buffer (1:20) y se prepararon los anticuerpos. En lo que se refiere al colágeno I se preparó una dilución 1:500 con Antibody Diluent with Background de Dako. Por otro lado la dilución para el colágeno IV fue de 1:50. Preparadas las diluciones y finalizados los baños de Wash buffer, los portaobjetos se dejaron escurrir y se secaron respetando los cortes (esto se realizó todas las veces que hubo que añadir un nuevo reactivo e incubarlo en la cámara húmeda), tras seguidamente introducirlos en la cámara húmeda y añadir 100 µl de las diluciones de los anticuerpos (menos en el control negativo que solo se le incorporó el Antibody Diluent with Background) y dejar actuar durante 2 horas. Para conseguir su identificación, hubo que añadir a las muestras con el primer anticuerpo, 100 µl por muestra de Labelled polymer, una sustancia específica de los anticuerpos, durante media hora (esto se realizó después del lavado

por triplicado de Wash buffer 1:20, justo después de las dos horas en la cámara húmeda). Finalizado el tiempo en la cámara húmeda se volvió a realizar el lavado por triplicado de Wash buffer y se procedió a realizar el revelado utilizando como cromágeno la diaminabencidina (DAB). Gracias a esta solución, el Labelled polymer unido a los anticuerpos se oxida por la presencia de la peroxidasa en dicho reactivo, revelando de esta forma la distribución del colágeno. Finalizados los cinco minutos de revelado se hicieron tres lavados en agua destilada de 5 minutos, y un contraste con hematoxilina de Harris, durante 2 minutos, para crear un contraste en las muestras. Se eliminó el exceso de hematoxilina con dos baños de agua destilada de 5 minutos, para posteriormente deshidratar, aclarar y montar con DPX.

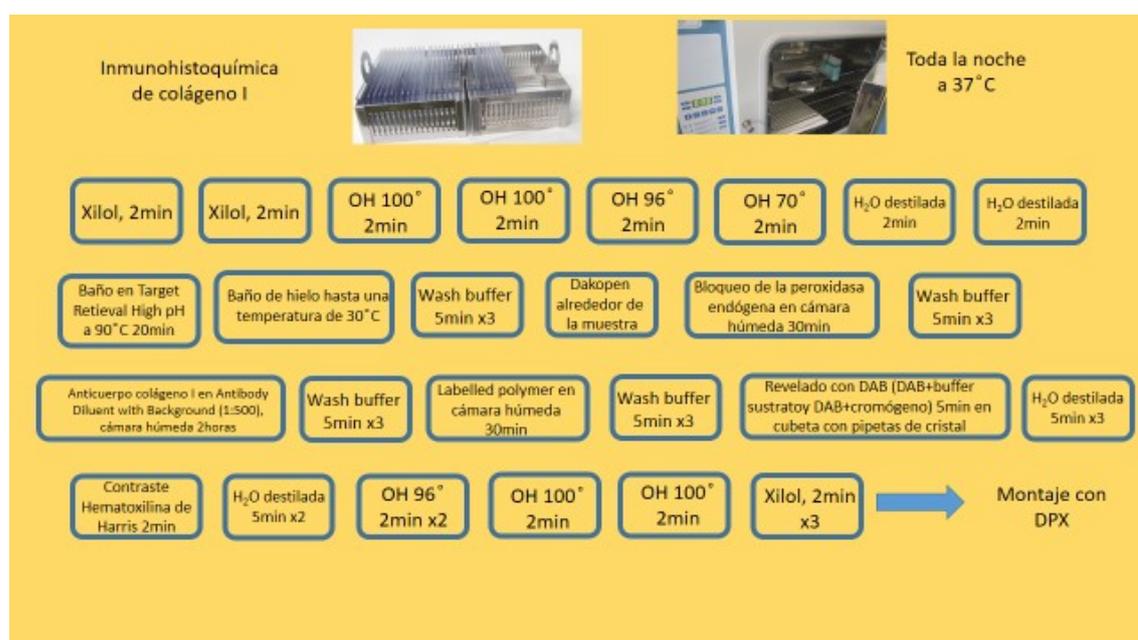


Figura 28: Tinción de inmunohistoquímica de colágeno I.

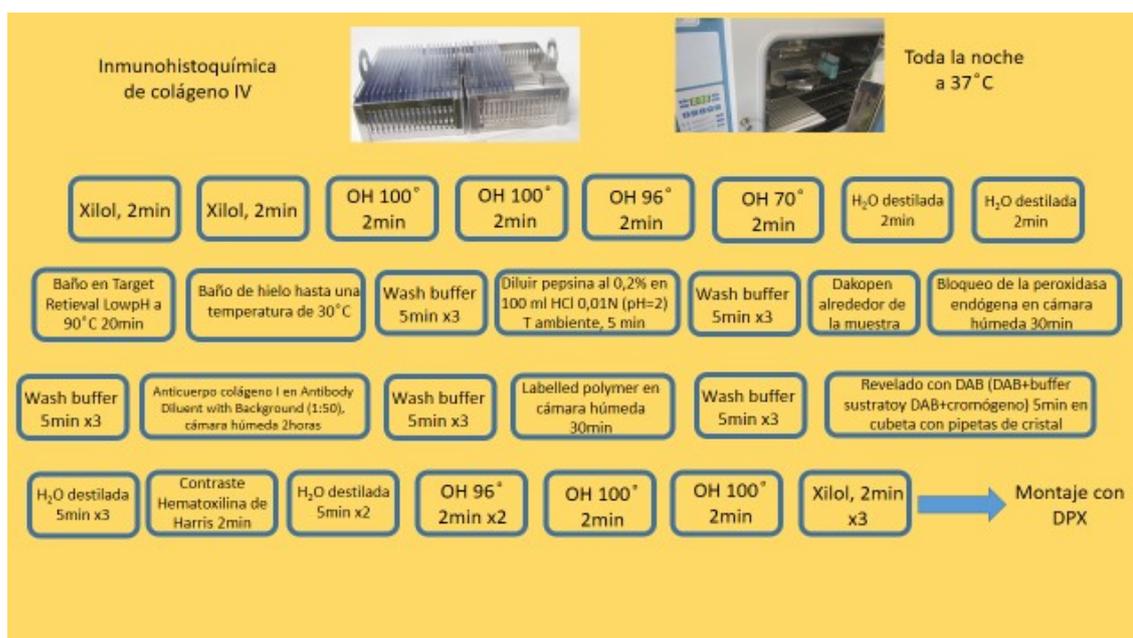


Figura 29: Tinción de inmunohistoquímica de colágeno IV.

Una vez las tinciones fueron realizadas y clasificadas por tratamiento y tipo de tinción (30.1), se tomaron fotos (30.2) de los distintos tratamientos del último muestreo realizado (145 días). Las fotos tomadas a 4x y 10x aumentos fueron procesadas con la ayuda del Picasa, versión 3.9.141 (Google, Inc. California USA), ya que de esta forma las imágenes quedaban más nítidas (Figura 30.3 y 30.4). Por otro lado, se pudo analizar la cantidad de colágeno formado en el músculo mediante un programa de análisis de imagen, Image-pro Plus The Proven Solution, versión 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc. Rockville USA), mediante el cual se midió el área total ocupada por el colágeno en las muestras teñidas (Figura 30.5).

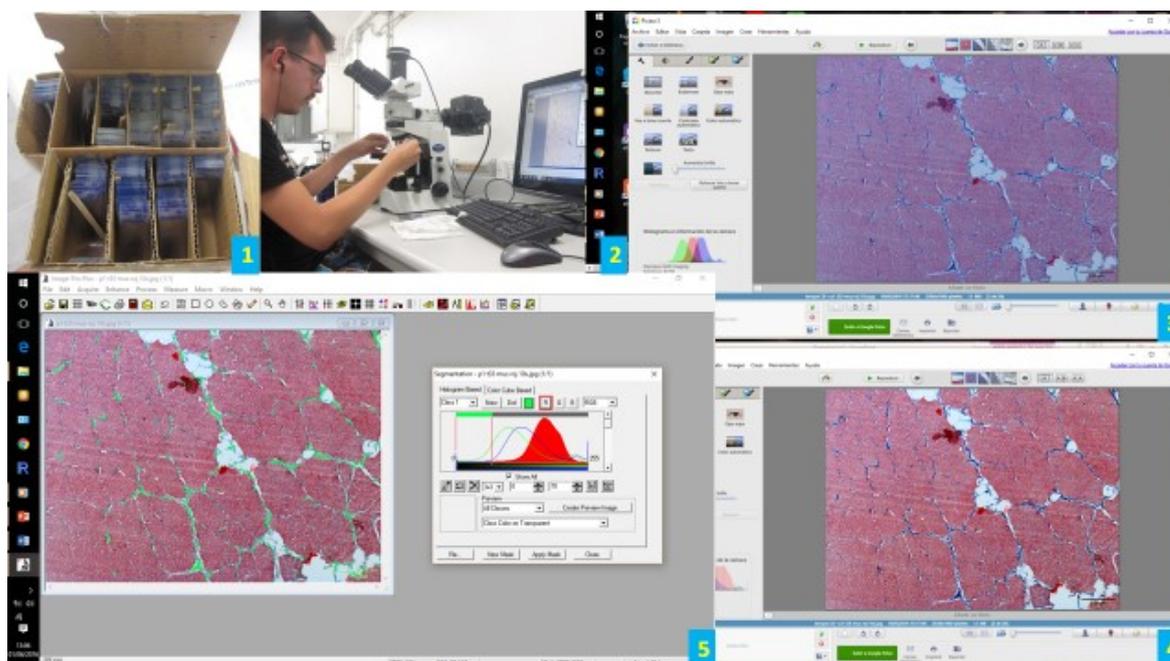


Figura 30: Realización de fotos y procesamiento de imágenes. 1 (cortes teñidos), 2 (realización de fotos), 3 (imagen sin usar Picasa 3), 4 (imagen usando Picasa 3) y 5 (medición del área ocupada por el colágeno).

### 3.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos, a lo largo de la experiencia, fueron analizados con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). Para determinar los posibles efectos achacables a las dietas, se realizó una comparación de medias (ANOVA de un factor). Las diferencias significativas entre las medias fueron evaluadas mediante el test de Duncan. Por otro lado, se realizó un estudio de la evolución del peso ganado durante la experiencia, para ello se realizó una comparación entre pendiente según el siguiente test (Ginés *et al.*, 2004):

$$t_{\text{exp}} = |b_i - b_j| / [S^2_D \{ (1/(xx)_i) + (1/(xx)_j) \}]^{1/2}$$

Donde  $b_i$  y  $b_j$  son las pendientes de los tratamientos  $i$ -ésimo y  $j$ -ésimo respectivamente,  $S^2_D$  es la varianza promedio y  $(xx)_i$  y  $(xx)_j$  son las sumas de cuadrados de los tratamientos  $i$ -ésimo y  $j$ -ésimo respectivamente.

Por último, para determinar las relaciones entre parámetros de textura, histológicos y de composición bioquímica se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson.

## 4. Resultados

### 4.1. Crecimiento y utilización del alimento

La inclusión de hidroxinolina (Hyp) en las dietas experimentales a los niveles propuestos no afectó a la aceptación de las mismas, no encontrándose diferencias significativas en el consumo medio diario (CMD) en los dos primeros muestreos, a 43 y 99 días de experimentación (Tabla VI). Sí que fueron diferentes los consumos en el último periodo de estudio. Ello provocó un significativo mayor consumo en las dietas HM y HH (4,52 y 4,79 g de pienso/día respectivamente) comparadas con la dieta C (4,04 g/día) y la de menor suplementación, la dieta HL (3,24 g/día), siendo estas dos últimas no diferentes entre ellas.

Los pesos medios determinados en los distintos muestreos, así como la tasa de crecimiento estándar (SGR) y el índice de conversión del alimento (FCR)), se muestran igualmente en la Tabla VI, presentado las diferencias significativas que se obtuvieron en los distintos periodos entre muestreos; desde el inicio hasta los 45, 99 y 143 días.

Por lo que se refiere a las comparaciones de los pesos, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla VI). Al analizar los coeficientes de variación, se obtuvieron valores más elevados en el tratamiento C ( $14,72 \pm 0,57$ ) que para el resto de tratamientos (HL:  $10,92 \pm 0,50$ ; HM:  $12,25 \pm 0,66$ ; HH:  $12,41 \pm 1,13$ ), en cualquier caso en todos el coeficientes estaban por encima del 10%.

Tabla VI: Peso (g), tasa de crecimiento estándar (SGR), índice de conversión de alimento (FCR) y consumo medio diario (CMD) (g/día) durante los distintos periodos del experimento. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=60).

	Dietas			
	C	HL	HM	HH
peso inicial	611,8 $\pm$ 87,76	607,71 $\pm$ 68,15	609,79 $\pm$ 75,47	607,56 $\pm$ 70,1
peso 45	672,67 $\pm$ 103,86	667,76 $\pm$ 71,85	706,83 $\pm$ 83,6	691,88 $\pm$ 80,75
peso 99	720,35 $\pm$ 107,41	711,86 $\pm$ 81,2	759,81 $\pm$ 99,76	757,33 $\pm$ 94,23
peso 143	766,57 $\pm$ 108,7	751,178 $\pm$ 77,23	809,22 $\pm$ 94,45	809,95 $\pm$ 113,36
SGR ini-45	0,19 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,08
SGR ini-99	0,34 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,35 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,48 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	0,51 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
SGR ini-143	0,50 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,63 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,61 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
FCR ini-45	3,32 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	3,22 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>	2,27 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	2,53 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>
FCR ini-99	4,08 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	4,09 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	3,09 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	3,01 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
FCR ini-143	3,72 $\pm$ 0,54	3,21 $\pm$ 0,42	3,23 $\pm$ 0,43	3,39 $\pm$ 0,35
CMD ini-45	4,50 $\pm$ 0,6	4,30 $\pm$ 0,45	4,90 $\pm$ 0,35	4,72 $\pm$ 0,65
CMD ini-99	4,50 $\pm$ 0,41	4,30 $\pm$ 0,25	4,68 $\pm$ 0,25	4,65 $\pm$ 0,37
CMD ini-143	4,04 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	3,24 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	4,52 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	4,79 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ); la ausencia de letras implica que no hay diferencias significativas.

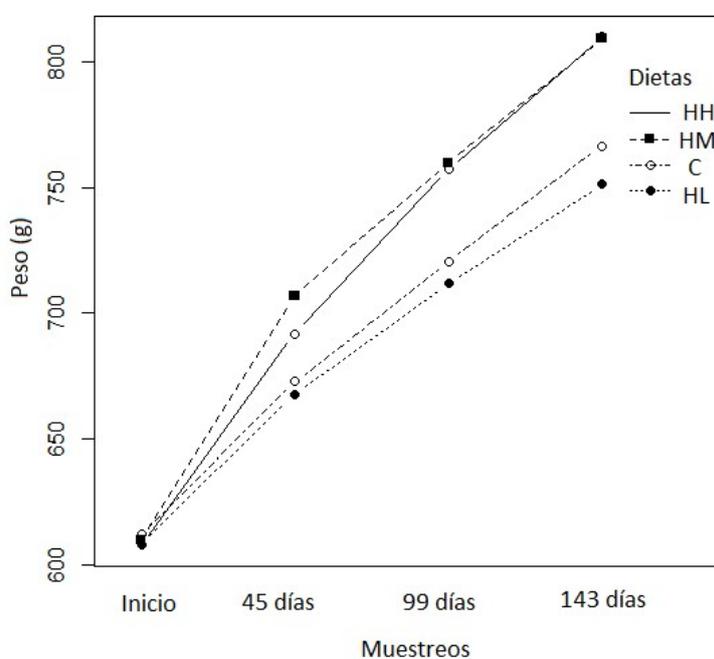


Figura 31: Progresión del peso ganado a lo largo de la experiencia realizada.

Cuando se analizan las ecuaciones de predicción para la evolución del peso en las distintas dietas (Tabla VII), los valores para la ganancia media diaria fueron desde 0,99 y 1,06 g/día para los tratamientos HL y C respectivamente, hasta los 1,35 y 1,40 g/día para el HM y HH respectivamente. Al comparar dichas pendientes, se observaron diferencias significativas entre la dieta HH y las dietas C y HL (Tabla VIII). Teniendo los peces alimentados con el tratamiento HH una mejor pendiente de crecimiento con respecto a las dietas C y HL. En el caso de la dieta HM frente a la C y HL, la probabilidad se quedó por debajo del 90%.

Tabla VII: Ecuaciones de predicción para el peso (g) en función de los días de experimentación.

dieta	$W = W_0 + b * T$	SEE	R <sup>2</sup> (%)
C	616,27 + 1,06 T	7,36	99,2
HL	613,65 + 0,99 T	8,83	98,6
HM	624,14 + 1,35 T	19,92	96,4
HH	616,04 + 1,40 T	12,44	98,6

W: peso (g); W<sub>0</sub>: peso inicial (g); b: pendiente; T: días de experimentación; SEE: error estándar de la estima; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación.

Tabla VIII: Valores de t<sub>exp</sub> obtenidos en la comparación de pendientes para el peso.

	C	HL	HM
HL	0,729		
HM	1,451	1,799	
HH	2,782 *	2,902 *	0,215

\*: P<0,05.

En relación al SGR, calculado para los distintos intervalos de tiempo, se apreciaron diferencias significativas entre la dieta C (0,34) y la HH (0,51), en el periodo que abarcó desde el inicio hasta los 99 días de experiencia. En lo que se refiere al intervalo inicio-143, se observaron diferencias significativas entre las dietas C (0,50) y HL (0,47) frente a las de mayor inclusión,

HM (0,63) y HH (0,61), siendo estas dos últimas no diferentes significativamente entre ellas (Tabla VI).

El FCR fue significativamente mejor en los peces alimentados con las dietas de mayor porcentaje de suplementación hasta el segundo muestreo a los 99 días. Sin embargo, al final del periodo experimental no se detectaron diferencias significativas.

## 4.2. Parámetros de textura analizados

En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos con el texturómetro. Tanto en las determinaciones realizadas sobre el pez entero, así como en las del filete crudo y del filete cocinado, no se encontraron diferencias significativas.

*Tabla IX:* Parámetros de textura en pez entero, filete crudo y filete cocinado de lubina alimentada con las distintas dietas experimentales. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=15). Ausencia de letras implica que no hay diferencias significativas.

	dietas			
	C	HL	HM	HH
<b>Pez entero</b>				
Dureza	2,20 $\pm$ 0,57	2,39 $\pm$ 0,52	2,12 $\pm$ 0,41	2,14 $\pm$ 0,32
Elasticidad	0,90 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,03
Cohesividad	0,78 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,09	0,79 $\pm$ 0,05
Gomosidad	1,72 $\pm$ 0,45	1,90 $\pm$ 0,44	1,73 $\pm$ 0,40	1,70 $\pm$ 0,32
Masticabilidad	1,54 $\pm$ 0,43	1,75 $\pm$ 0,45	1,60 $\pm$ 0,43	1,54 $\pm$ 0,32
Recuperación	0,60 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,05
<b>Filete crudo</b>				
Dureza	18,45 $\pm$ 3,25	17,30 $\pm$ 1,63	16,24 $\pm$ 2,31	17,48 $\pm$ 2,95
Elasticidad	0,42 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,04
Cohesividad	0,27 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,03
Gomosidad	5,06 $\pm$ 1,29	4,91 $\pm$ 0,81	4,70 $\pm$ 1,03	4,95 $\pm$ 1,09
Masticabilidad	2,21 $\pm$ 0,65	2,02 $\pm$ 0,57	2,16 $\pm$ 0,74	2,06 $\pm$ 0,60
Recuperación	0,22 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,03
Fracturabilidad	8,35 $\pm$ 1,78	8,94 $\pm$ 1,77	8,22 $\pm$ 2,32	8,32 $\pm$ 2,89
<b>Filete cocinado</b>				
Dureza	13,19 $\pm$ 6,19	10,92 $\pm$ 4,53	10,90 $\pm$ 6,35	11,04 $\pm$ 3,65
Elasticidad	0,30 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,039
Cohesividad	0,51 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,05
Gomosidad	7,06 $\pm$ 3,83	5,51 $\pm$ 2,59	5,57 $\pm$ 3,77	4,49 $\pm$ 2,16
Masticabilidad	2,44 $\pm$ 1,65	1,74 $\pm$ 0,87	2,41 $\pm$ 1,93	1,29 $\pm$ 0,64
Recuperación	0,14 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,03

La matriz de correlaciones entre el peso y la composición proximal del músculo con el parámetro de textura más representativo tanto para pez entero, como para filete crudo y cocinado, se presenta en la Tabla X. El mayor coeficiente de correlación fue el establecido entre la humedad y el contenido en lípidos (-0,784), variando ambos de forma inversamente proporcional. En cambio entre la proteína y la humedad, aunque con menor nivel de significación, la correlación fue positiva (0,319). El peso también presentó una correlación significativa y negativa (-0,372) con el contenido en humedad. Por su parte, el contenido en proteína presentó correlaciones negativas tanto con el contenido en grasa (-0,547) como con el contenido en colágeno (-0,501).

En lo que se refiere a los parámetros de textura, para la dureza del pez entero se encontró una correlación significativa y negativa con el peso (-0,299); por otro lado fue positiva con la humedad (0,365). En el filete crudo no se estableció ninguna correlación significativa. Pero en el filete cocinado hay que destacar la que se encontró con el contenido en colágeno (0,306).

Tabla X: Matriz de correlaciones (coeficiente de Pearson; significación) entre peso, variables de composición proximal y de textura (n=60).

	peso	cenizas	colágeno	lípidos	humedad	proteína
cenizas	,265 ,051					
colágeno	,265 ,050	,133 ,333				
lípidos	,211 ,123	,133 ,333	,163 ,236			
humedad	<b>-,372**</b> ,005	-,148 ,280	-,216 ,113	<b>-,784**</b> ,000		
proteína	-,006 ,963	-,010 ,941	<b>-,501**</b> ,000	<b>-,547**</b> ,000	<b>,319*</b> ,018	
dureza pez entero	<b>-,299*</b> ,027	-,103 ,455	-,053 ,698	-,132 ,336	<b>,365**</b> ,006	-,243 ,074
dureza filete crudo	-,107 ,452	,029 ,837	-,064 ,651	,103 ,467	,012 ,934	-,052 ,713
dureza filete cocinado	,030 ,835	-,250 ,080	<b>,306*</b> ,031	,083 ,569	-,148 ,304	-,236 ,099

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$

### 4.3. Composición proximal y perfil de ácidos grasos

Los resultados del análisis de composición proximal y del contenido en colágeno en los muestreos inicial, intermedio a los 43 días, y final a la conclusión del periodo experimental, se muestran en la Tabla XI. Las únicas diferencias significativas entre dietas se detectaron en el muestreo intermedio para el caso del porcentaje de humedad, algo más alto en los filetes de los peces alimentados con la dieta C. Sin embargo, entre muestreos, fueron ligeramente superiores aunque con significación estadística, los porcentajes de proteína en el muestreo final frente al intermedio (Muestreo final; C:  $21,89 \pm 0,78$ ; HL:  $21,98 \pm 0,72$ ; HM:  $21,98 \pm 0,63$ ; HH:  $22,31 \pm 0,97$ . Muestreo intermedio; C:  $20,66 \pm 1,12$ ; HL:  $21,47 \pm 1,68$ ; HM:  $21,13 \pm 0,74$ ; HH:  $21,21 \pm 0,8$ ). El porcentaje de cenizas también fue mayor en el muestreo inicial frente a los otros dos, los cuales no fueron diferentes entre ellos.

En lo que respecta al perfil de ácidos grasos presentes en los filetes, se puede apreciar una mayor cantidad de ácidos grasos saturados en los provenientes de los peces alimentados con dietas suplementadas con Hyp (Figura 32). Estas diferencias se debieron a los menores niveles tanto de ácido palmítico (16:0) como de ácido esteárico (18:0) en los peces alimentados con la dieta C (Tabla XII).

El ácido oleico (18:1n-9) presente en el músculo de los peces que consumieron la dieta HM fue significativamente distinto al resto de dietas, presentando el mayor contenido en dicho ácido graso. Esta diferencia se trasladó al total de los ácidos grasos monoinsaturados, ya que dicho ácido graso es el mayoritario (Tabla XII).

En lo que se refiere al ácido linoleico (18:2n-6) y al total de ácidos grasos de la serie omega-6 (*n*-6), se apreciaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, siendo la dieta C la que mostró los valores más altos. La inclusión de Hyp promovió una menor y significativa deposición de estos ácidos grasos, más manifiesta a partir de los niveles de las dietas HM y HH,

ya que aun siendo también menor con la dieta HL, en este caso no estadísticamente diferente de la dieta C (Tabla XII).

Centrando la comparación en el total de ácidos grasos de la serie omega-3 ( $n-3$ ), se pudo apreciar que los tratamientos C, HM y HH fueron los que presentaron un mayor contenido, siendo el HL el de menor concentración. Dentro de los  $n-3$ , el ácido alfa-linolénico (18:3 $n-3$ ) fue significativamente menor en la dieta HL. Por otro lado, el EPA (20:5 $n-3$ ) presentó una mayor concentración en la dieta HH, la cual fue significativamente distinta al tratamiento HL. Por lo que respecta al DHA (22:6 $n-3$ ), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Tampoco hubo diferencias significativas en sumatorio total de ácidos grasos  $n-3$  de cadena larga (Tabla XII).

Cabe destacar que la relación de  $n-3$  con respecto a  $n-6$  fue mayor en los tratamientos con mayor concentración de Hyp (HH y HM), siendo significativamente diferentes a la dieta con menor concentración (HL) (Tabla XII).

Tabla XI: Composición proximal (en porcentaje sobre peso húmedo) y de colágeno en los filetes de lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=15).

	dietas								
	muestreo inicial	muestreo intermedio				muestreo final			
		C	HL	HM	HH	C	HL	HM	HH
humedad	71,69 $\pm$ 1,30	72,63 $\pm$ 1,24 <sup>ab</sup>	73,04 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	71,95 $\pm$ 1,16 <sup>ab</sup>	71,53 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	72,53 $\pm$ 1,42	72,13 $\pm$ 0,88	71,67 $\pm$ 0,75	72,45 $\pm$ 0,78
proteína	21,94 $\pm$ 0,80 <sup>xy</sup>	20,66 $\pm$ 1,12 <sup>y</sup>	21,47 $\pm$ 1,68 <sup>y</sup>	21,13 $\pm$ 0,74 <sup>y</sup>	21,21 $\pm$ 0,8 <sup>y</sup>	21,89 $\pm$ 0,78 <sup>x</sup>	21,98 $\pm$ 0,72 <sup>x</sup>	21,98 $\pm$ 0,63 <sup>x</sup>	22,31 $\pm$ 0,97 <sup>x</sup>
colágeno	1,37 $\pm$ 0,60	1,27 $\pm$ 0,11	1,24 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,09	1,22 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,09	1,23 $\pm$ 0,06
lípidos	4,30 $\pm$ 1,80	4,42 $\pm$ 1,22	3,52 $\pm$ 1,57	4,37 $\pm$ 1,10	4,63 $\pm$ 0,71	3,45 $\pm$ 1,21	3,68 $\pm$ 1,18	4,07 $\pm$ 0,95	3,33 $\pm$ 0,99
cenizas	1,38 $\pm$ 0,12 <sup>x</sup>	1,16 $\pm$ 0,10 <sup>y</sup>	1,20 $\pm$ 0,11 <sup>y</sup>	1,14 $\pm$ 0,08 <sup>y</sup>	1,24 $\pm$ 0,08 <sup>y</sup>	1,13 $\pm$ 0,16 <sup>y</sup>	1,19 $\pm$ 0,11 <sup>y</sup>	1,17 $\pm$ 0,11 <sup>y</sup>	1,12 $\pm$ 0,13 <sup>y</sup>

Letras diferentes en la misma línea (x,y,z), o en la misma línea dentro de cada muestreo (a,b,c), indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Ausencia de letras implica que no existen diferencias significativas.

Tabla XII: Perfil de ácidos grasos (g de ácido graso/100 g grasa) en los filetes de lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=15).

	dietas			
	C	HL	HM	HH
14:0	1,68 $\pm$ 0,13	1,74 $\pm$ 0,14	1,72 $\pm$ 0,11	1,71 $\pm$ 0,13
16:0	15,69 $\pm$ 0,79 <sup>c</sup>	16,61 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	16,44 $\pm$ 0,69 <sup>ab</sup>	16,11 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup>
18:0	3,88 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	4,14 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	4,08 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	4,08 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>
$\Sigma$ saturados	21,79 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>	23,03 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	22,78 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	22,46 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>
18:1n-9	29,76 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>	29,78 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>	30,49 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	29,90 $\pm$ 1,18 <sup>b</sup>
$\Sigma$ monoinsaturados	37,99 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>	38,05 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>	38,99 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	38,28 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>
18:2n-6	21,92 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>	21,49 $\pm$ 1,73 <sup>ab</sup>	20,17 $\pm$ 1,51 <sup>c</sup>	20,85 $\pm$ 1,73 <sup>bc</sup>
20:4n-6	0,82 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,12	0,79 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,15
$\Sigma$ n-6	23,93 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	23,50 $\pm$ 1,71 <sup>ab</sup>	22,19 $\pm$ 1,49 <sup>c</sup>	22,93 $\pm$ 1,64 <sup>bc</sup>
18:3n-3	2,91 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	2,71 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	2,85 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	2,91 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
20:5n-3	2,74 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	2,64 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	2,78 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	2,88 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>
22:6n-3	7,81 $\pm$ 1,04	7,28 $\pm$ 1,14	7,50 $\pm$ 0,78	7,66 $\pm$ 1,19
$\Sigma$ n-3	15,33 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	14,38 $\pm$ 1,68 <sup>b</sup>	15,02 $\pm$ 1,25 <sup>ab</sup>	15,34 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>
$\Sigma$ LCn-3	11,45 $\pm$ 1,35	10,74 $\pm$ 1,58	11,16 $\pm$ 1,13	11,46 $\pm$ 1,65
n-3/n-6	0,65 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	0,62 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,68 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), la ausencia de letras expresa la falta de diferencias significativas.

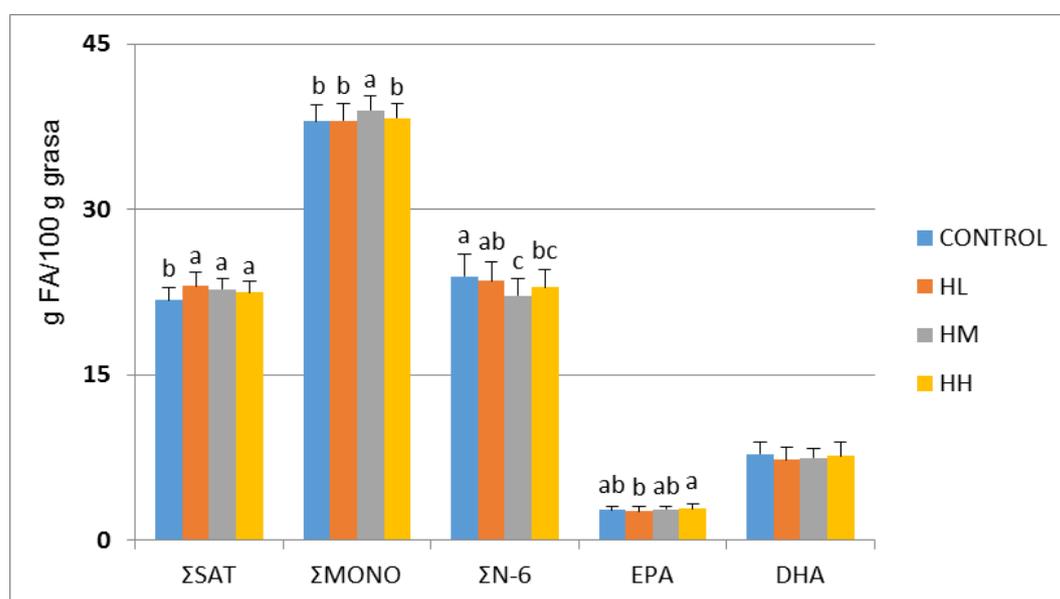


Figura 32: Diferencias en la composición de ácidos grasos en los filetes de lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales (ΣSAT: sumatorio de ácidos grasos saturados; ΣMONO: sumatorio de ácidos grasos monoinsaturados; ΣN-6: sumatorio de ácidos grasos omega-6; EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ácido docosahexaenoico (22:6n-3) (Diferentes letras dentro de cada grupo indican diferencias significativas;  $P < 0,05$ ).

#### 4.4. Análisis histológico

Como se puede apreciar en la Figura 33, el área ocupada por el colágeno en el músculo blanco fue mayor en los organismos alimentados con Hyp en comparación a los alimentados con la dieta control. Por lo tanto, se puede decir que la inclusión de Hyp en dietas de finalización de lubinas provoca un aumento del colágeno en el tejido conectivo que rodea el músculo blanco.

Por otro lado en lo que se refiere al músculo rojo, se han apreciado diferencias significativas en el área del colágeno I (Figura 34), siendo mayor en los animales alimentados con una dieta suplementada con Hyp. Por otro lado, se apreció una mayor superficie ocupada por el colágeno IV en los peces tratados con Hyp, sin embargo dicha diferencia no fue significativa. En lo que respecta a la tinción con tricrómico, el área teñida fue mayor para los peces alimentados con la dieta control, aunque esta diferencia no fue significativa.

Por los datos obtenidos de área ocupada por colágeno, se pudo comprobar que la Hyp fomenta la formación de colágeno en el tejido conectivo de las fibras musculares especialmente en el músculo blanco, donde existen diferencias significativas a favor de los organismos tratados con Hyp. Por lo que se refiere al músculo rojo, se pudo observar que existe un efecto en la formación de colágeno intramuscular de tipo I, sin embargo el colágeno IV no presentó diferencias significativas. Por lo tanto, se pudo afirmar que la Hyp no tiene efectos sobre la formación de colágeno IV en las fibras del músculo rojo.

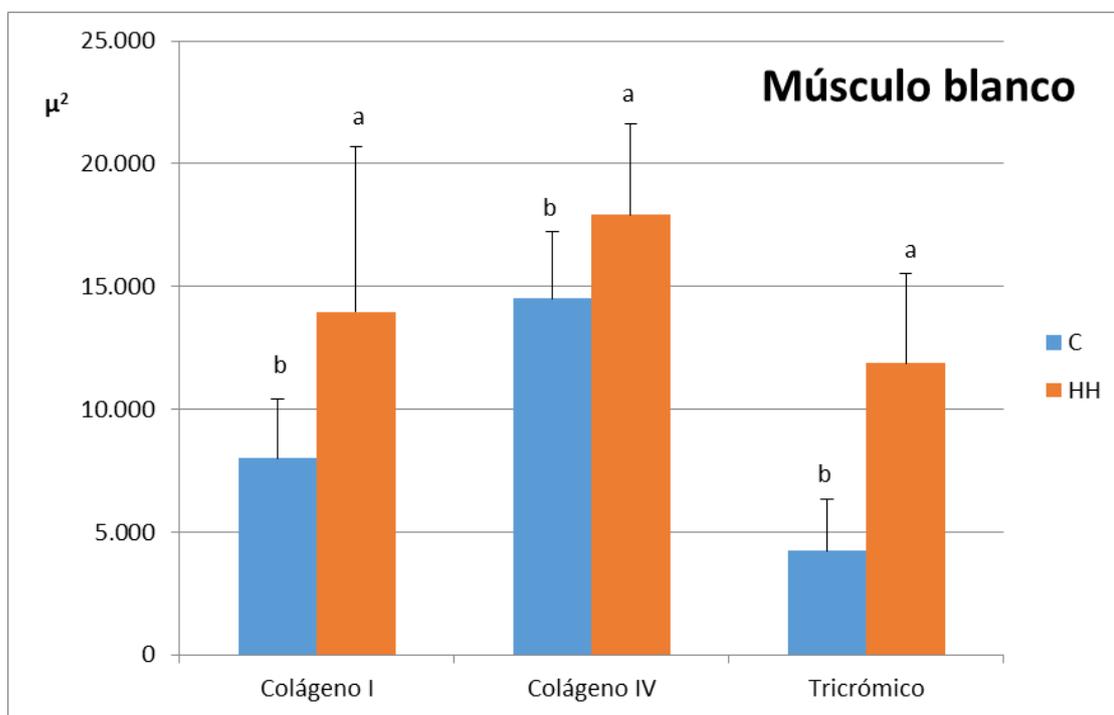


Figura 33: Área ( $\mu^2$ ) ocupada por el colágeno en el músculo blanco en las preparaciones inmunohistoquímicas (colágeno I y IV) y con tricrómico (Diferentes letras dentro de cada grupo indican diferencias significativas;  $P < 0,05$ ).

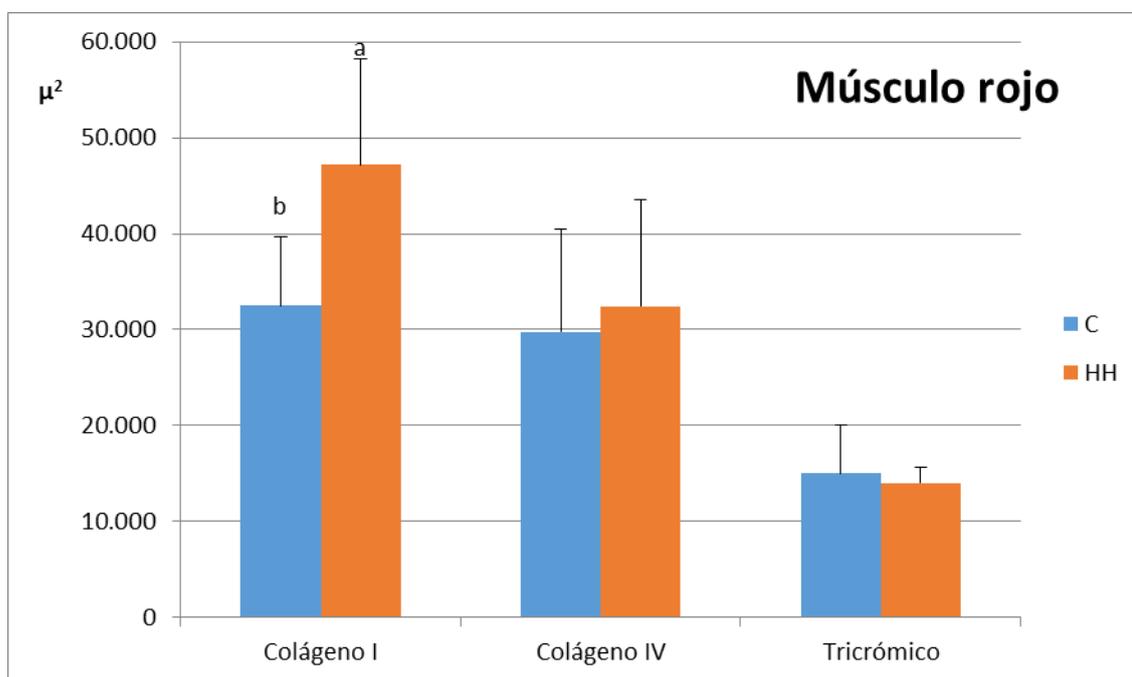


Figura 34: Área ( $\mu^2$ ) ocupada por el colágeno en el músculo rojo en las preparaciones inmunohistoquímicas (colágeno I y IV) y con tricrómico (Diferentes letras dentro de cada grupo indican diferencias significativas;  $P < 0,05$ ).

Se realizaron comparaciones de las tinciones de colágeno I y IV, con el objetivo de apreciar diferencias en la estructura organizativa de los paquetes de fibras musculares del músculo rojo (Figura 35). Al comparar imágenes histológicas de colágeno I del tratamiento control frente al HH, se pudo ver una mejor organización de los paquetes musculares en los pertenecientes al tratamiento HH (Figura 35 B). En las muestras tratadas con la dieta control no se apreció una definición clara de los paquetes de fibras musculares, siendo difícil apreciar las agrupaciones de las diferentes fibras (Figura 35 A). Al realizar la misma comparación con las muestras de colágeno IV (Figura 36), se apreció un efecto similar al observado con el colágeno I.

Otro aspecto que se apreció en las imágenes de músculo rojo analizadas fue el tamaño de las fibras musculares. Al observar las imágenes de las muestras tratadas con la dieta con alto contenido en Hyp (Figura 35 B y D), se aprecia un mayor diámetro en las células musculares que en las muestras tratadas con la dieta control (Figura 35 A y C).

En lo que se refiere al músculo blanco (Figura 36), se realizaron el mismo tipo de comparaciones que para el músculo rojo. Se pudo observar una mayor presencia de tejido conectivo en las imágenes correspondientes a los tratamientos con elevada concentración de Hyp (Figura 36 B y D), comparándolas con las de dieta control (Figura 36 A y C). Cabe destacar que también se apreció una organización más compleja de las fibras musculares.

Por último, también se compararon las muestras teñidas con tricrómico de Masson, para músculo rojo y músculo blanco (Figura 37). En lo que se refiere al músculo rojo, se distinguió una mejor organización de los paquetes musculares, de las muestras tratadas con Hyp a las tratadas con la dieta control (Figura 37 A y B). Por lo que respecta al músculo blanco (Figura 37 C y D), también se vio una mejor organización, así como una mayor presencia de fibras conectivas en los peces alimentados con dietas enriquecidas con Hyp (Figura 37 D).

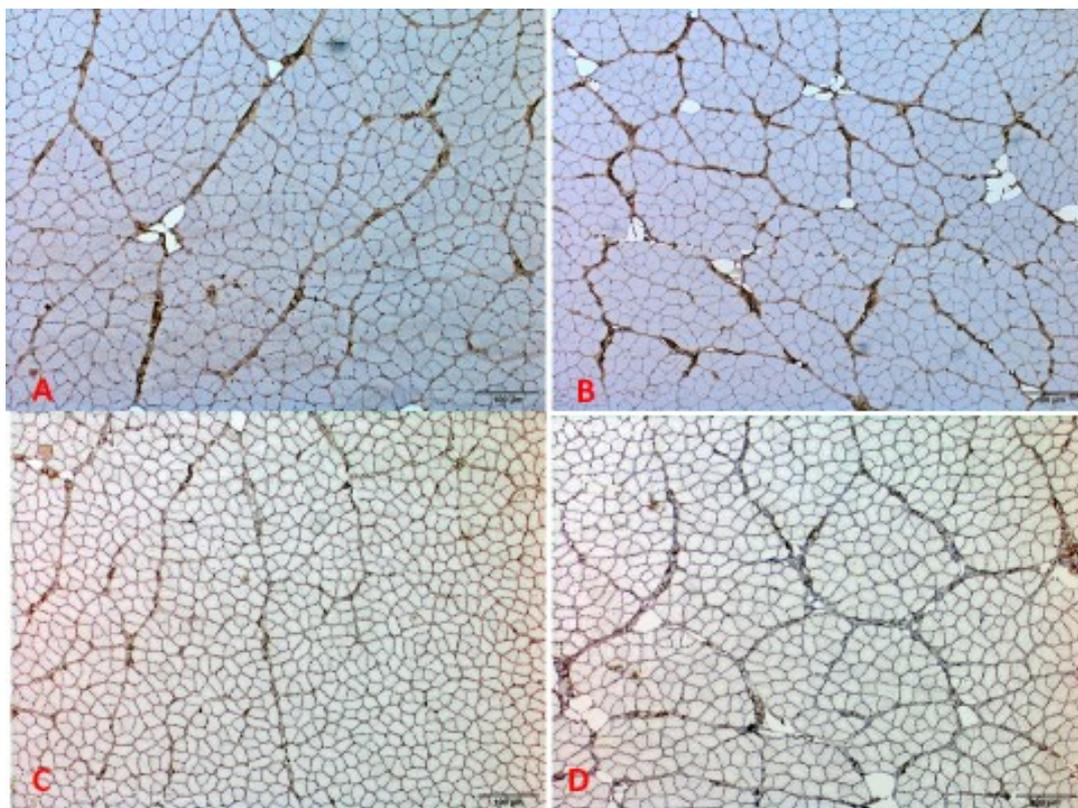


Figura 35: Comparaciones de la organización de los paquetes de las fibras musculares, para el colágeno I y IV del músculo rojo. (A: Colágeno I dieta control; B: colágeno I dieta HH; C: colágeno IV dieta control; D: colágeno IV dieta HH) (tinción inmunohistoquímica a 10x).

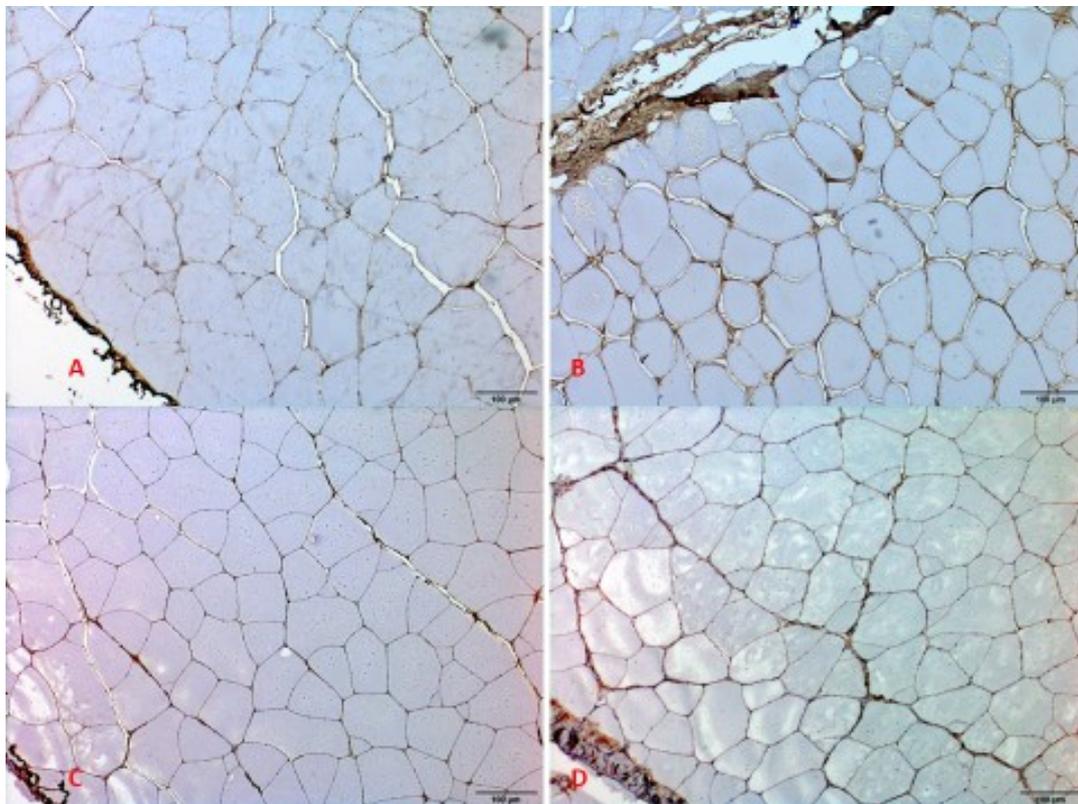
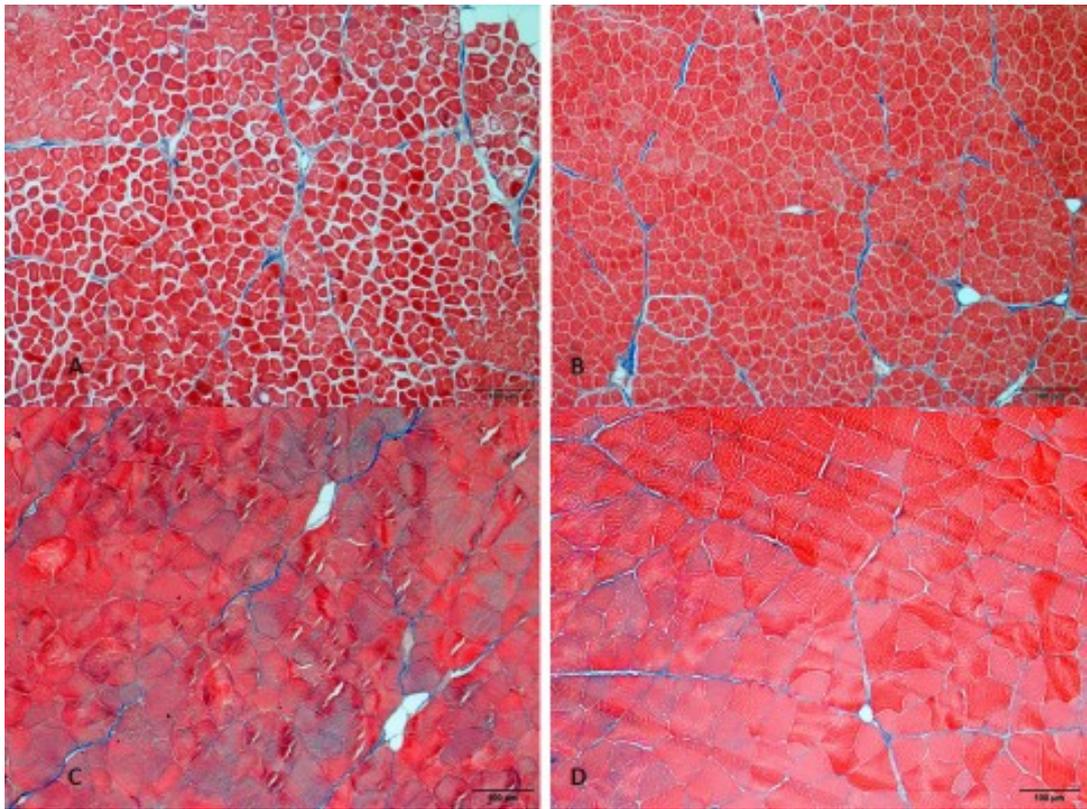


Figura 36: Comparaciones de muestras de tejido muscular blanco (A: colágeno I dieta control; B: colágeno I HH; C: colágeno IV tratamiento control; D: colágeno IV dieta HH).



*Figura 37:* Comparaciones de musculo rojo y blanco para las tinciones realizadas con tricrómico de Masson (A: músculo rojo dieta control; B: músculo rojo tratamiento HH; C: músculo blanco dieta control; D: músculo blanco tratamiento HH).

## 5. Discusión

El consumo de pescado es fundamental para llevar una dieta sana (Mozaffarian y Rimm 2006; Harris *et al.*, 2008; 2009). Es la principal fuente de omega-3 y su ingesta previene problemas en el sistema cardiovascular y demás ventajas relacionadas con desequilibrios alimenticios, así como una disminución del colesterol en sangre y de accidentes cerebrovasculares o partos prematuros (Daviglius *et al.*, 2002; Patterson, 2002; Bouzan *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2005a, b; König *et al.*, 2005; McMichael y Butler, 2005; Willett, 2005; Rossary *et al.*, 2014). Estos argumentos se demuestran al ver estudios realizados en países donde la elevada ingesta de pescado está relacionada con la baja tasa de infartos de miocardio (Kagawa *et al.*, 1982; Sekikawa *et al.*, 2008; Usydus *et al.*, 2009). A la inversa, una baja tasa de consumo implica un mayor número de problemas cardiovasculares (Rahmawaty *et al.*, 2013). Sin embargo los consumidores tienden a rechazar el pescado de acuicultura debido a la mala imagen que tienen de este producto (Bouzan *et al.*, 2005; Verbeke *et al.*, 2005). Esa imagen negativa se intenta mejorar incluyendo en la dietas hidroxiprolina, un aminoácido presente en los tejidos animales y esencial condicional para los peces (Li *et al.*, 2009), obteniendo así pescado más firme ya que precisamente la menor firmeza es uno de los parámetros que los consumidores achacan al pescado de acuicultura (Claret *et al.*, 2014).

En la formulación de piensos para peces, hay una progresiva inclusión de harinas vegetales junto con aminoácidos esenciales (Chor *et al.*, 2015; Monge-Ortiz *et al.*, 2016), ya que la limitada disponibilidad de harinas de pescado hace que estos presenten elevados valores en el mercado (Tacon y Metian, 2008). Por ello, es necesario incluir diferentes componentes para de alguna forma mejorar los piensos y satisfacer las necesidades fisiológicas de los animales. Son escasos los trabajos publicados sobre los efectos que presenta la inclusión de Hyp en dietas para peces. Entre dichos estudios, Aksnes y colaboradores (2008) realizaron una experiencia con salmón Atlántico (*Salmo salar* L.) de 100 g de peso, en la que valoraron la repercusión que tenía la inclusión de

distintas dosis de Hyp en dietas con elevados contenidos de harinas vegetales tanto sobre el crecimiento de los peces como en el desarrollo vertebral, en ambos casos mejoraban los resultados con el aporte de Hyp. Por otro lado, en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.), los trabajos en los que se incluye Hyp como suplemento en dietas con proporciones elevadas de harinas vegetales aportan resultados contradictorios, ya que concluyen tanto que mejora el crecimiento (Liu *et al.*, 2014) como que no se ve afectado (Zhang *et al.*, 2013). En ambos experimentos trabajaron con juveniles de rodaballo de alrededor de 8 g y prolongaron las experiencias durante dos meses en condiciones similares en cuanto a tamaño de tanques y densidades. Habiendo diferencias en la temperatura del agua, siendo significativo el efecto de la Hyp al criar entre 19 y 22°C (Liu *et al.*, 2014), mientras que no hay diferencias si la temperatura oscila entre 15 y 18°C (Zhang *et al.*, 2013). El presente trabajo tiene una complicación añadida ya que se centra en peces de gran tamaño (desde 400 g a más de un 1 kg) lo cual implica la obtención de coeficientes de variación por encima del 10 %, provocando que no se aprecien diferencias entre tratamientos, así como un tiempo de tratamiento más extenso (143 días). En cualquier caso, se pudo comprobar una tendencia al aumento de peso conforme se añadía más Hyp a la dieta. De hecho, al realizar las regresiones de peso medio y los días de experimentación se obtuvieron coeficiente de determinación muy altos, esto junto con la comparación de pendientes permitieron establecer una relación entre la Hyp administrada a las dietas y el crecimiento de los peces.

Por lo que se refiere al consumo medio diario (CMD), se han apreciado diferencias durante el periodo que abarca todo el experimento (ini-143), pudiendo decir que la mayor presencia de Hyp en las dietas fomentó la ingesta de las lubinas. Esto puede estar relacionado con una mejor palatabilidad de los piensos probados en las lubinas (García Romero *et al.*, 2014) o un incremento del consumo relacionado con el aumento de tamaño de los peces. Es destacable, la mejora en la conversión del alimento (FCR) durante una buena parte del periodo experimental (ini-99 e ini-45),

diferencia que dejó de ser significativa cuando los peces alcanzaron las mayores tallas. Teniendo en cuenta que los períodos de engorde suelen ser de tres meses ( $\approx 90$  días), la alimentación de lubinas con dietas ricas en Hyp tiene una buena conversión y el alimento es aprovechado. Con lo que respecta a la tasa de crecimiento (SGR), durante los períodos más largos de la experiencia (ini-99 e ini-143) se apreciaron aumentos significativos en los tratamientos con mayor incorporación de Hyp, siendo las diferencias más atenuadas en el último intervalo del experimento (ini-145). Por lo que demuestran los datos, la inclusión de Hyp en las dietas de lubina incrementa el crecimiento de los peces en períodos de larga duración.

Es destacable el trabajo realizado por Zhang y colaboradores (2013; 2015), los cuales determinaron que la incorporación de Hyp en la dieta de juveniles de rodaballo no mejoró el crecimiento de estos peces. Sin embargo, estos autores si encontraron un incremento en la concentración de colágeno en el músculo. Y constatando estos cambios en la cantidad de colágeno formado, los autores determinaron que podrían afectar a las características del filete tales como la textura, el sabor, etc. Parece lógico, ya que el colágeno presenta funciones importantes tanto estructurales como funcionales en tejidos e influyen en la propiedad de la textura, así como en la funcionalidad y extensibilidad del filete (Hatae *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1986, 1988; Aidos y Espe, 1990; Sato *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2007; Gordon y Hahn, 2010), siendo el tejido conectivo intramuscular de los peces donde se puede encontrar en gran medida dicha molécula (Sato *et al.*, 1988; Hatae *et al.*, 1989; Suárez *et al.*, 2007). El hecho que la Hyp sea uno de los aminoácidos más abundante en esta proteína (Barbul, 2008), explica la importancia que este aminoácido representa para la textura del filete. En lo que se refiere a las comparaciones de los distintos parámetros de textura medidos en lubina, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, a diferencia de lo que se ha constatado en rodaballo (Liu *et al.*, 2014). Sin embargo, se encontraron coeficientes de correlaciones significativos entre el peso, las distintas variables del análisis proximal y la dureza del pez entero y del filete cocinado. Interpretando los distintos coeficientes de correlación, teniendo en cuenta las diferencias significativas entre las pendientes de la progresión de peso, se pudo afirmar que en lubinas de mayor peso, la dureza en

el pez entero tiende a reducirse. Esta tendencia también se aprecia con el mismo patrón afectando a la humedad, la cual está relacionada de forma negativa con la cantidad de grasa. Por otro lado, la cantidad de grasa disminuye la concentración de proteínas, teniendo esta una correlación negativa con el nivel de colágeno en el filete. Además, la concentración del colágeno a nivel muscular es explicativa de la dureza del filete cocinado. Por lo tanto, se puede deducir que incrementos en el peso producen cambios en la proporción del colágeno en el filete, con la consecuente modificación de la textura del filete tras el cocinado (Hatae et al., 1986; Ayala et al., 2005; Periago et al., 2005). Este hecho puede mejorar las características sensoriales del producto que los consumidores demandan (Veland y Torrissen, 1999), fomentando de esta forma el consumo y la imagen del pescado de acuicultura por la población (Claret et al., 2014). Es destacable, que dichos datos se han obtenido sin que las muestra hayan sido congeladas previamente, evitando de esta manera pérdida de tejido conectivo, formado principalmente por colágeno (Sato et al., 1988; Hatae et al., 1989; Suárez et al., 2007), con su consecuente pérdida de textura (Ayala et al., 2005; Suárez et al., 2006; Caballero et al., 2009). Son destacables los resultados obtenidos por Zhang y colaboradores (2015), en lo referente a la Hyp libre en el plasma y en el músculo, así como el colágeno total en el músculo; siendo estos significativamente mayores en las dietas suplementadas con Pro + Hyp. También destacar que los autores recientemente nombrados, observaron un incremento en la expresión génica de la Prolyl 4-hydroxylase  $\alpha$  (P4H  $\alpha$ (I)), la cual controla la actividad de la Prolyl 4-hydroxylase, una enzima clave en el catabolismo de 4-Hyp a partir de los residuos de Pro presentes en las cadenas de colágeno. Este gen se expresó en gran medida y significativamente en los hígados y músculo de los juveniles de rodaballo alimentados con una dieta rica en Pro, en comparación con la dieta Pro + Hyp y la control. A su vez la diferencia entre el tratamiento Pro + Hyp y control también fue significativa, siendo la dieta mixta mayor en la expresión génica. Parece ser que hay diversos aa que tienen cierta repercusión en la formación de colágeno en los peces, sin embargo la composición aminoacídica del colágeno es variada (Barbul, 2008), un conocimiento de los efectos de cada aa sería necesaria para poder mejorar las dietas administradas y conseguir unos mejores resultados.

Así como realizar más pruebas bioquímicas, como es el análisis de aa en el plasma y en la masa muscular en lubina. De esta forma se podrían esclarecer más conocimientos sobre el efecto la formación de colágeno en el músculo de lubina.

Por otro lado, en lo que se refiere al análisis proximal realizado en los filetes se encontraron diferencias solo en el contenido de cenizas entre los distintos muestreos realizados, sin presentar diferencias entre tratamientos. Estos resultados pueden indicar que la inclusión de Hyp no produce cambios en los datos del análisis proximal para lubina como son, la humedad, el contenido de colágeno, cantidad de grasa y cenizas. Es destacable que en el estudio realizado en rodaballo sí que se encontraron diferencias entre los tratamientos en lo que se refiere a las cenizas, presentando la dieta control valores más elevados y significativos, que las dietas a las que se les incorporó Pro-0,75 o Pro+Hyp (Zhang *et al.*, 2015). Estas diferencias entre experiencias pueden ser debidas al tamaño de los peces, pudiendo ser que en animales jóvenes las modificaciones pueden ser más dinámicas y en los de mayor tamaño la composición de colágeno es más estable.

Es destacable mencionar que la incorporaciones de ciertos aminoácidos en las dietas conllevan a un incremento de la grasa acumulada en los peces (Zhang *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2013). En lo que se refiere al perfil de ácidos grasos analizado en los filetes de lubina, ciertos ácidos grasos se encontraban en mayor cantidad en los peces alimentados con Hyp. En lo que se refiere a los ácidos grasos saturados, la dieta HL presentó el mayor valor significativo, así como el menor en la dieta C. Con las diferencias significativas encontradas, se pudo intuir que la inclusión de Hyp en las dietas de lubinas incrementa la deposición de ácidos grasos saturados. En lo que se refiere a los ácidos grasos monoinsaturados, la presencia fue mayor en la dieta HM, por lo que la Hyp también fomenta la presencia de ácidos graso monoinsaturados en las lubinas que ingirieron dietas suplementadas. En lo que se refiere a los omega-6 los análisis determinaron que la inclusión de Hyp disminuye la concentración del sumatorio de estos ácidos grasos y concretamente la

deposición de 18:2n-6. Por otro lado, al centrarse en los sumatorios de omega-3 se pudo apreciar un mayor valor en las dietas HH y C, presentando el valor más bajo, y significativamente diferente a las dietas recién mencionadas, la dieta HL. De estos resultados se pudo determinar que una dieta con una baja inclusión de Hyp no fomenta la incorporación de omega-3 en el filete de lubina. Al fijarse en omega-3 concretos, como es el 20:5n-3 y el 18:3n-3 se constató que a mayor concentración de Hyp más se depositaron dichos ácido grasos. Aunque el valor de la dieta HH fue mayor que la C, este segundo tratamiento no presento diferencias con la dieta con más Hyp. Por lo que estos ácidos grasos siguieron el mismo patrón que los sumatorios de omega-3. Cabe destacar que el ácido graso 22:6n-3 (DHA) no presento diferencias entre tratamientos, por lo que se puede pensar que la inclusión de Hyp en las dietas no tiene efectos sobre la incorporación de DHA en los filetes de lubina. En lo que se refiere a la relación omega-3/omega-6, las dietas con mayores contenidos en Hyp (HH y HM) presentaron los valores más altos para dicha relación, aunque la dieta C fue significativamente igual a HH y HM. Se pudo decir que niveles bajos de Hyp conllevan a una disminución en la relación omega-3/omega-6. Es evidente que la inclusión de Hyp crea cambios en la composición de ácidos grasos y estos cambios pueden afectar a las características sensoriales, conllevando a una modificación en la calidad del filete (Izquierdo *et al.*, 2003). Estas variaciones en los niveles de ácidos grasos esenciales en una dieta sana (Mozaffarian y Rimm 2006; Harris *et al.*, 2008; 2009), pueden modificar el sabor que presenten los filetes de lubina (Grigorakis *et al.*, 2003; Olsson *et al.*, 2003; Sveinsdóttir *et al.*, 2009), mejorando o empeorando la percepción del consumidor por los productos de origen acuícola (Claret *et al.*, 2014).

Los análisis histológicos de los cortes de músculo pueden dar información visual, la cual nos puede aportar datos adicionales a un estudio de estas características. El tejido muscular de los peces se divide en músculo rojo y blanco y la cohesión de esta masa muscular está regulada por el tejido conectivo, rico en colágeno (Love *et al.*, 1969, 1972). Dicha proteína se divide en varias tipos, siendo el colágeno tipo I y V los más abundantes en el músculo, encontrando también de tipo III y IV. En cuanto al colágeno V, es destacable comentar que su mayor proporción en el

músculo conlleva a crear fibras musculares más delgadas (Ando *et al.*, 1999), lo cual puede estar relacionado con la textura en el filete cocinado (Ginés *et al.*, 2004). Abdel y colaboradores (2005) determinaron que la celularidad del músculo blanco está relacionado con la textura o los parámetros organolépticos. Si nos fijamos en los datos obtenidos en el análisis de imagen de las muestras histológicas, observamos que hay diferencias significativas en el contenido de colágeno entre los tratamientos HH y C. En lo que se refiere al colágeno I, se han obtenido valores más altos de área ocupada, en las fibras musculares tanto rojas como blancas, para los peces alimentados con dieta rica en Hyp. Se puede argumentar que, la inclusión de Hyp en dietas para lubina fomenta la formación de colágeno I, tanto en músculo rojo como en blanco. En lo que se refiere al colágeno IV el área ocupada en el músculo blanco fue significativamente mayor para las dietas enriquecidas con Hyp, sin embargo en el músculo rojo no hubo diferencias significativas, aunque el área en peces alimentados con Hyp fue mayor. Por otro lado, en las comparaciones de las tinciones de tricrómico de Masson fueron significativamente mayores en el músculo blanco para los peces tratados con Hyp, sin embargo en el músculo rojo no se encontraron diferencias. Por otro lado, al realizar comparaciones visuales de los cortes histológicos se apreció una mejor organización del músculo en los peces alimentados con las dietas ricas en Hyp, viendo claramente los paquetes de fibras musculares. Sin embargo, también es destacable el hecho de que las fibras musculares en la dieta C presentaban un diámetro aparentemente inferior al de las lubinas tratadas con Hyp, aumentando con ello la firmeza del músculo (Hurling *et al.*, 1996). Por lo que respecta a las lubinas alimentadas con las dietas suplementadas, al tener un diámetro mayor de fibras musculares, el efecto sería el contrario. En futuras experiencias sería interesante comprobar la presencia de colágeno V en las muestras de lubina, ya que este colágeno se relaciona con diámetros de fibras pequeños y es uno de los más abundantes en el tejido muscular (Ando *et al.*, 1999).

## 6. Conclusiones

1. La inclusión de un 2 % de hidroxiprolina en dietas comerciales para lubina mejoró los índices productivos en relación al crecimiento y la eficiencia en la utilización del pienso.
2. No se apreció una mejora en los parámetros de textura del filete. Sin embargo el hecho de que el diámetro de las fibras musculares aumentase en los peces alimentados con dietas suplementadas con hidroxiprolina, puede ser la causa de que no se hayan podido apreciar diferencias entre los tratamientos.
3. La mayor área de distribución de colágeno en el músculo blanco, refleja el efecto de este aminoácido en la creación de colágeno intramuscular, así como la importancia que representa dicho tipo de musculo en la textura de peces cultivados. Se puede decir que la incorporación de Hyp en la dieta de lubinas, incrementó el nivel organizativo de las células musculare, debido a una mayor formación de colágeno en el tejido conectivo.

## 7. Bibliografía

Abdel I., López-Albors O., Ayala Ma.D., García-Alcazar A., Abellán E., Latorre R. y Gil f. (2005). Muscle cellularity at cranial and caudal levels of the trunk musculature of commercial size sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*. 34 (5), 280-285.

Abeywardena M.Y. y Patten G.S. (2011). Role of  $\omega$ 3 long chain polyunsaturated fatty acids in reducing cardio-metabolic risk factors. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets*. 11 (3), 232-246.

Aguilera F., Quevedo A. y López P. (2015). Kinetics of protein and textural changes in Atlantic salmon under frozen. *Food Chemistry*. 182, 120-127.

Aidos I., Lie Ø. y Espe M. (1990). Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1440-1444.

Aksnes A., Mundheim H., Toppe J. y Albrektsen S. (2008). The effect of dietary hydroxyproline supplementation on salmon (*Salmo salar* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture*. 275, 242–249.

Alasalvar C., Taylor K.D.A., Zubcov E., Shahidi F. y Alexis M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*. 79, 145–150.

Andersen U.B., Thomassen M.S. y Rørå A.M.B. (1997). Texture Properties of Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of Diet, Muscle Fat Content and Time of Storage on Ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 74, 347-353.

Andersen S.M., Holen E., Aksnes A., Ronnestad I., Zerrahn J.-E. y Espe, M. (2013). Dietary arginine affects energy metabolism through polyamine turnover in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British Journal of Nutrition*. 110 (11), 1968-1977.

- Ando M., Toyohara H. y Sakaguchi M. (1992). Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by the desintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi* (Boletín de la sociedad japonesa para la ciencia en peces). 58(3), 567-570.
- Ando M., Nishiyabu A., Tsukamasa Y. y Makinodan Y. (1999). Post mortem Softening of Fish Muscle During Chilled Storage as Affected by Bleeding. *Journal Food Science*. 64(3), 423-428.
- A.O.A.C. (1980). Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. Washington, D.C.
- APROMAR (2015). Informe La Acuicultura en España.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995). *Official Methods of Analytical Chemists International*. 16th edición. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1-45.
- Ayala M.D., López O.A., Blanco A. García A.A., Abellán E., Ramírez Z.G. y Gil F. (2005). Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*. 250 (1-2), 215-231.
- Baker D.H. (2009). Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids*. 37, 29-41.
- Barbul A. (2008). Proline precursors to sustain mammalian collagen synthesis. *Journal of Nutrition*. 138 (10), 2021S-2024S.
- Baumann K. H., Hessel F., Larass I., Muller T., Angerer P., Kiefl R. y von Schacky C. (1999). Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 Unsaturated Fatty Acids and Growth Factor and Cytokine Gene Expression in Unstimulated and Stimulated Monocytes: A Randomized Volunteer Study. *American Heart Association, Inc*. 19(1), 59-66.
- Belitz HD y Grosch W. (1988). Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia.

- Bouzan C., Cohen J.T., Connor W.E., Kris-Etherton P.M., Gray G.M., Konis A., Lawrence R.S., Savitz D.A. y Teutsch, S.M. (2005). A quantitative analysis of fish consumption and stroke risk. *Am. J. Prev. Med.* 29, 347–352.
- Bremner H.A. y Hallet I.C. (1985). Muscle fibre-connective tissue junctions in the blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). *Journal Food Science.* 50, 975-980.
- Caballero M.J, Betancor M., Escrig J.C., Montero D., Espinosa de los Monteros a., Castro P., Ginés R. y Izquierdo M. (2009). Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture.* 291, 210-216.
- Carson C. y Hassel C. Educating high risk Minnesotans about dietary fats, blood cholesterol and heart diseases (1994). *Journal of the American Dietetic Association.* 94, 659–60.
- Chor W.K., Lim L.S., Chong M., Lu K.C., Sade A. y Shapawi R. (2015). Evaluation of tempeh as a potential alternative protein source in the diets for juvenile tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Malaysian Journal of Science.* 34 (1), 58-68.
- Christie W.W. (1993). Preparation of lipid extracts from tissues. In: *Advances in Lipid Methodology – Two.* 195-213 (edited by W.W. Christie, Oily Press, Dundee).
- Claret i Coma A. (2014). Percepción e imagen de los consumidores españoles del pescado salvaje y del pescado de acuicultura. Programa doctorado en tecnología. Universidad de Girona. 91 pag.
- Claret A., Guerrero L., Ginés R., Grau A., Hernández M. D., Aguirre E., Peleteiro J.B., Fernández-Pato C. and Rodríguez-Rodríguez C. (2014) Consumer beliefs regarding farmed versus wild fish. *Appetite.* 79, 25-31.
- Cohen J.T., Bellinger, D.C. y Shaywitz B.A. (2005a). A quantitative analysis of prenatal methyl mercury exposure and cognitive development. *Am. J. Prev. Med.* 29, 353–365.
- Cohen, J.T., Bellinger D.C., Connor W.E. y Shaywitz B.A. (2005b). A quantitative analysis of prenatal intake of n-3 polyunsaturated fatty acids and cognitive development. *Am. J. Prev. Med.* 29, 366–374.

Cohen, J.T., Bellinger D.C., Connor W.E., Kris-Etherton P.M., Lawrence R.S., Savitz D.A., Shaywitz B.A., Teutsch S.M. y Gray G.M. (2005c). A Quantitative Risk–Benefit Analysis of Changes in Population Fish Consumption. *Am J Prev Med.* 29(4), 325–334.

Costell, E., Tarrega, A. y Bayarri, S. (2010). Food acceptance: The role of consumer perception and attitudes. *Chemosensory Perception*, 3(1), 42-50.

Daviglus M., Sheeshka, J. y Murkin E. (2002). Health benefits from eating fish. *Comments Toxicol.* 8, 345–374.

Erkkilä A.T., Lichtenstein A.H., Mozaffarian D. y Herrington D.M. (2004). Fish intake is associated with a reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 80, 626 –32.

FAO (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma.

FEAP (2015). European Aquaculture Production Report 2005-2014.

Folch J., Lees M. y Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry.* 226 (1), 497-509.

García del Moral R., O´Valle F.J., Quesada M.J. y Rodríguez M.D. (1993). Laboratorio de anatomía patológica. Madrid: McGraw-Hill.

García-García, B., Hernández, M. D., Cárdenas, S., Muñoz, J. L., Rodríguez, C., Carrasco, J., *et al.* (2008). Análisis sensorial de cinco especies de espáridos (besugo, dentón, hurta, pargo y sargo picudo) en ocho localidades costeras españolas. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Secretaría General Técnica.

García-Romero J., Ginés R., Izquierdo M.S., Haroun R., Badilla R., Robaina L. (2014). Effect of dietary substitution of fish meal for marine crab and echinoderm meals on growth performance, ammonia

excretion, skin colour, and flesh quality and oxidation of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*. 422–423, 239–248.

Ginés R., Valdimarsdóttir T., Sveinsdóttir K. y Thorarésen H. (2004). Effects of rearing temperature and strain on sensory characteristics, texture, color and fat of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Food Quality and Preference*. 15, 177-185.

Gordon M.K. y Hahn R.A. (2010). Collagens. *Cell and Tissue Research*. 339 (1), 247-257.

Graber G., Allen N.K. y Scott H.M. (1970). Proline essentiality and weight gain. *Poultry Science*. 49, 692-697.

Grant M.E. y Prockop D.J. (1972). The biosynthesis of collagen. *New England Journal of Medicine*. 286 (4), 194-199.

Grigorakis K., Taylor K.D.A., Alexis M.N. (2003). Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture*. 225, 109–119.

Guerrero, L. (2001). Marketing PDO (Products with Denominations of Origin) and PGI (Products with Geographical Identities). En L. Frewer, Risvik, E. and Schifferstein, H.. *Food, people and society: a European Perspective of Consumers' Food Choices*. New York: Springer Verlag. En Claret i Coma A. (2014). Percepción e imagen de los consumidores españoles del pescado salvaje y del pescado de acuicultura. Programa doctorado en tecnología. Universidad de Girona. 91 pag.

Hagen Ø., Solberg C. y Johnston I.A. (2006). Sexual dimorphism in fast muscle fibre recruitment in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*. 261, 1222-1229.

Hagen Ø., Solberg C., Sirnes E. y Johnston I.A. (2007). Biochemical and Structural Factors Contributing to Seasonal Variation in the Texture of Farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 5803-5808.

- Harris W.S., Kris-Etherton P.M. y Harris K.A. (2008). Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. *Current Atherosclerosis Reports*. 10 (6), 503-509.
- Harris M., Bruhn C., Schor D., Kapsak W.R. y Blakistone B. (2009). Communicating the net benefits of seafood consumption. *Food Technology*. 63 (11), 38-44.
- Hatae K., Tobimatsu A., Takeyama M. y Matsumoto J.J. (1986). Contribution of the connective tissues on the texture difference of various fish species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52 (11), 2001-2007.
- Hatae K., Lee K.H., Tsuchiya T. y Shimada A. (1989). Textural properties of cultured and wild fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (2), 363-368.
- He K. (2009). Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease—Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? *Progress in Cardiovascular Diseases*. 52, 95–114.
- He K., Liu K., Daviglius M.L., Swords N., Mayer-Davis E., Jiang R., Steffen L., Siscovick D., Tsai M. y Herrington D. (2009). Associations of Dietary Long-Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Fish With Biomarkers of Inflammation and Endothelial Activation (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). *Am J Cardiol*. 103, 1238–1243.
- Hu C.A., Khalil S., Zhaorigetu S., Liu Z., Tyler M., Wan G. y Valle D. (2008). Human  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase: Function and regulation. *Amino acids*. 35, 665-672.
- Hurling R., Rodell J.B. y Hunt H.D. (1996). Fiber diameter and fish texture. *Journal of Texture Studies*. 27 (6), 679-685.
- Izquierdo M.S., Arakawa T., Takeuchi T., Haroun R. y Watanabe T. (1992). Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 105, 73-82.

- Izquierdo M.S., Obach A., Arantzamendi L., Montero D., Robaina L. (2003). Dietary lipid sources for seabream and sea bass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquac. Nutr.* 9, 397–407.
- Kagawa Y., Nishizawa M., Suzuki M., Miyatake T., Hamamoto T., Goto K., Motonaga E., Izumikawa H., Hirata H. y Ebihara A. (1982). Eicosapolyenoic acids of serum lipids of Japanese islanders with low incidence of cardiovascular diseases. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology.* 28 (4), 441-453.
- Kamphuis M.H., Geerlings M.I., Tjshuis M. AR, Kalmijn S., Grobbee D.E. y Kromhout D. (2006). Depression and cardiovascular mortality: a role for n–3 fatty acids?. *Am J Clin Nutr.* 84, 1513–7.
- Kaul S., Sharma S.S. y Mehta I.K. (2008). Free radical scavenging potential of L-proline: Evidence from *in vitro* assays. *Amino Acids.* 34, 315-320.
- Kinnucan H., Xiao H., Hsia CH. y Jackson J. (1997). Effect of health information and generic advertising on US meat demand. *American Journal of Agricultural Economics.* 79, 3–23.
- Kirchgessner M., Fickler J. y Roth F.X. (1995). Effect of dietary proline supply on N-balance of piglets. Communication on the importance of nonessential amino acids for protein retention. *Anim. Physiol. Anim. Nutri.* 73, 57-65.
- Kole, A. P. W. (2003). Consumer opinions towards farmed fish, accounting for relevance and individual knowledge. En J. B. Luten, J. Oehlenschläger y G. Ölafsdóttir (2003). *Quality of Fish from Catch to Consumer. Labelling, Monitoring and Traceability.* The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- König A., Bouzan C., Cohen J.T., Connor W.E., Kris-Etherton P.M., Gray G.M., Lawrence R.S., Savitz D.A. y Teutsch S.M. (2005). A quantitative analysis of fish consumption and coronary heart disease mortality. *Am. J. Prev. Med.* 29, 335–346.
- Lehninger A.L. (1982). Proteínas fibrosas. Principios de bioquímica (pp. 147-168). Barcelona: Ediciones Omega, S.A.

- Linden G. y Lorient D. (1996). Bioquímica agroindustrial. Zaragoza: Acribia S.
- Li P., Mai K.S., Trushenski J. y Wu G.Y. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*. 37, 43-53.
- Li X., Bickerdike R., Lindsay E., Campbell P., Nickell D., Dingwall A. y Johnston I.A. (2005). Hydroxylysyl Pyridinoline Cross-Link Concentration Affects the Textural Properties of Fresh and Smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6844-6850.
- Li X.L., Rezaei R., Li P. y Wu G.Y. (2011). Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids*. 10, 1159-1168.
- Liu, Y., He, G., Wang, Q., Mai, K., Xu, W. y Zhou, H. 2014. Hydroxyproline supplementation on the performances of high plant protein source based diets in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*. 433, 476-480.
- Lopez-Garcia E., Schulze M.B., Manson J.E., Meigs J.B., Albert C.M., Rifai N., Willett W.C., y Hu F.B. (2004). Consumption of (n-3) Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Activation in Women. *J. Nutr.* 134, 1806–1811.
- Love R.M. (1988). The Food Fishes-Their Intrinsic Variation and Practical Implications. Farrand Press, London, UK.
- Love R.M., Lavety J. y Steel P.J. (1969). The connective tissues of fish. II. Gaping in comercial species of frozen fish in relation to rigor mortis. *J. Fd. Technol.* 4, 39-44.
- Love R.M., Haq M.A. y Smith G.L. (1972). The connective tissues of fish. V. Gaping in cod of different sizes as influenced by a seasonal variation in the ultimate pH. *J. Fd. Technol.* 7, 281-290.
- Luna L., Fernández J. M., Incera M. y Duque C. (2004). Hábitos de consumo de dorada y lubina en España en el periodo 2003-2004. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- McMichael A.J. y Butler C.D. (2005). Fish, health, and sustainability. *Am. J. Prev. Med.* 29, 322–323.

- Mizerski RW (1982). An attribution explanation of the disproportionate influence of unfavorable information. *Journal of Consumer Research*. 9, 301–10.
- Monge-Ortiz R., Martínez-Llorens S., Márquez L., Moyano F.J., Jover-Cerdá M. y Tomás-Vidal A. (2016). Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Archives of Animal Nutrition*. 70 (2), 155-172.
- Moreno H.M., Montero M.P., Gómez-Guillén M.C., Fernández-Martín F., Mørkøre T. y Boderías J. (2012). Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture. *Food Chemistry*. 134 (2), 678-685.
- Mozaffarian D. y Rimm E.B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health evaluating the risks and the benefits. *Journal of the American Medical Association*. 296 (15), 1885-1899.
- Nurshall R. (1956). The Lateral Musculature and the Swimming of Fish. *Proc Zool Soc Lond*. 126-127.
- Olsson G.B., Olsen R.L., Carlehög M., Ofstad R. (2003). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*. 217 (1), 191–205.
- Patterson J. (2002). Introduction—comparative dietary risk: balance the risk and benefits of fish consumption. *Comments Toxicol*. 8,337–344.
- Periago M.J., Ayala M.D., López-Albors O., Abdel I., Martínez C., García-Alcázar A., Ros G., Gil F. (2005). Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*. 249, 175–188.
- Phang J.M., Donald S.P., Pandhare J. y Liu Y.M. (2008). The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids*. 35, 681-690.
- Phang J.M., Liu W. y Zabirnyk O. (2010). Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annual Review of Nutrition*. 30, 441-463.

- Raatz S.K., Silverstein J.T., Jahns L. y Picklo Sr. M.J. (2013). Issues of Fish Consumption for Cardiovascular Disease Risk Reduction. *Nutrients*. 5, 1081-1097.
- Rahmawaty S., Charlton K., Lyons-wall P. y Meyer B.J. (2013). Factors that influence consumption of fish and omega-3-enriched foods: A survey of Australian families with young children. *Nutrition & Dietetics*. 70, 286-293.
- Ramírez-García S., Carranza-Castro P.H., Gutiérrez-Salinas J., García-Ortiz L. y Hernández-Rodríguez S. (2012). Near-infrared spectroscopy: Application in medicine. *Medicina Interna de Mexico*. 28 (4), 365-370.
- Riediger N.D., Othman R.A., Suh M. y Moghadasian M.H. (2009). A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *Journal American Dietetic Association*. 109, 668-679.
- Rincón L. Castro P.L., Álvarez B., Hernández M.D., Álvarez A., Claret A., Guerrero L. y Ginés R. (2016). Differences in proximal and fatty acid profiles, sensory characteristics, texture, colour and muscle cellularity between wild and farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture*. 451, 195-204.
- Robenstein R. y Thurman W. (1996). Health risk and the demand for red meat: evidence from futures markets. *Review of Agricultural Economics*. 18, 629-41.
- Rossary A., Farges M-C., Lamas B., Miles E. A., Noakes P. S., Kremmyda L-S., Vlachava M., Diaper N.D., Robinson S.M., Godfrey K.M., Calder P.C., Vasson M-P. (2014). Increased consumption of salmon during pregnancy partly prevents the decline of some plasma essential amino acid concentrations in pregnant women. *Clinical Nutrition*. 33, 267-273.
- Sato K., Yoshinaka R., Sato M. y Shimizu Y. (1986). Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52(9), 1595-1600.
- Sato K., Yoshinaka R., Sato M., Itoh Y. y Shimizu Y. (1988). Isolation of types I and V Collagens from carp muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90 (1), 155-158.

Sato K., Ohashi C., Muraki M., Itsuda H., Yokoyama Y., Kanamori M., Ohtsuki K. y Kawabata M. (1998). Isolation of intact type V collagen from fish intramuscular connective tissue. *Journal of Food Biochemistry*. 22, 213-225.

Sekikawa A., J. Curb D., Ueshima H., El-Saed A., Kadowaki T., Abbott R.D., Evans R.W., Rodriguez B.L., Okamura T., Sutton-Tyrrell K., Nakamura Y., Masaki K., Edmundowicz D., Kashiwagi A., Willcox B.J., Takamiya T., Mitsunami K., Seto T.B., Murata K., White R.L., Kuller L.H., for the ERA JUMP (Electron-Beam Tomography, Risk Factor Assessment Among Japanese and U.S. Men in the Post-World War II Birth Cohort) Study Group (2008). Marine-Derived n-3 Fatty Acids and Atherosclerosis in Japanese, Japanese-American, and White Men. *Journal of the American College of Cardiology*. 52, 6.

Stanley, D.W. (1983). Relation of structure to physical properties of animal materials. En M. Peleg & E.B. Bagley (Eds.), *Physical properties of foods* (pag. 157-206). Westport, Connecticut: Avi Publish. Comp., Inc.

Stejskal V., Vejsada P., Cepak M., J. Špička J., Vacha F., Kouril J. y Policar T. (2011). Sensory and textural attributes and fatty acid profiles of fillets of extensively and intensively farmed Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Food Chemistry*. 129 (3), 1054-1059.

Suárez M.H. (2002). Efeito do resfriamento sobre a textura *post mortem* da carne do matrinxã *Brycon cephalus* (pisces: characiforme). Dissertação (Mestrado)-Florianópolis: Departamento de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciencias Agrarias, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

Suárez M.H., Pardo C.S., Beirão H.L., De Francisco B.A. y Okada N. L.L. (2006). Efecto de la súper refrigeración sobre la textura de la carne de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19, 2.

Suárez M.H., De Francisco B.A., Beirão H.L., Pardo C.S. y Cortés R.M. (2007). Post Mortem Lost of Texture of Fish Meat during Cold Storage. *Acta Biológica Colombiana*. 12 (1), 3-18.

Sveinsdóttir K., Martinsdóttir E., Green-Petersen D., Hyldeg G., Schelvis R., Delahunty C. (2009). Sensory characteristics of different cod products related to consumer preferences and attitudes. *Food Qual. Prefer.* 20 (2), 120–132.

Tacon Albert G.J. y Metian M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture.* 285, 146–158.

Teves J.F.C. y Ragaza J.A. (2016). The quest for indigenous aquafeed ingredients: A review. *Reviews in Aquaculture.* 8 (2), 154-171.

Usydus Z., Szlinder-Richert J. y Adamczyk M. (2009). Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. *Food Chemistry.* 112, 139–145.

Veland J.O. y Torrissen O.J. (1999). The texture of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle as measured instrumentally using TPA and Warner–Brazler shear test. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79, 1737-1746.

Verbeke W. y Ward R.W. (2001). A fresh meat almost ideal demand system incorporating negative TV press and advertising impact. *Agricultural Economics.* 25 (2-3), 359-374.

Verbeke W., Sioen I., Pieniak Z., Van Camp J. y De Henauw S. (2005). Consumer perception versus scientific evidence about health benefits and safety risks from fish consumption. *Publ. Health Nutr.* 8, 422–429.

Verbeke, W., Vermeir, I. y Brunso, K. (2007). Consumer evaluation of fish quality as basis for fish market segmentation. *Food Quality and Preference.* 18(4), 651-661.

Von Schacky C., Angerer P., Kothny W., Theisen K. y Mudra H. (1999). The Effect of Dietary w-3 Fatty Acids on Coronary Atherosclerosis A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *American College of Physicians-American Society of Internal Medicine.* 130, 554-562.

Willett W.C. (2005). Fish: Balancing health risks and benefits. *Am. J. Prev. Med.* 29, 320–321.

Wu G.Y., Flynn N.E. y Knabe D.A. (2000). Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 279, E395-E402.

Wu G.Y., Bazer F.W, Hu J.B., Johnson G.A. y Spencer T.E. (2005). Polyamine synthesis from proline in the developing porcine placenta. *Biology of Reproduction*. 72, 842-850.

Wu G.Y., Bazer F.W. y Burghardt R.C. (2010). Functional amino acids in swine nutrition and production. En: *Dynamics in Animal Nutrition*. Doppenberg J. et al. eds., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, (pag. 69-98)

Zhang Y., Dabrowski K., Hliwa P. y Gomulka P. (2006). Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid- or peptide-based diets. *Amino Acids*. 31, 165-172.

Zhang K., Ai Q., Mai K., Xu W., Liufu Z., Zhang Y. y Peng M. (2013). Effects of dietary hydroxyproline on growth performance, body composition, hydroxyproline and collagen concentrations in tissues in relation to prolyl 4-hydroxylase  $\alpha$ (I) gene expression of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus L.* fed high plant protein diets. *Aquaculture*. 404-405, 77-84.

Zhang K., Mai K., Xu W., Zhou H., Liufu Z., Zhang Y., Peng M., y Ai Q. (2015). Proline with or without Hydroxyproline Influences Collagen Concentration and Regulates Prolyl 4-Hydroxylase  $\alpha$  (I) Gene Expression in Juvenile Turbot. (*Scophthalmus maximus L.*). *J. Ocean Univ. China (Oceanic and Coastal Sea Research)*. 14, 541-548.