

Universidad de Almería
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Biotecnología



Trabajo Fin de Grado

**EVALUACIÓN DE LA MICROALGA *Chlorella fusca* COMO
INGREDIENTE EN PIENSOS PARA LISA (*Chelon labrosus*).**

Alumno

Isidro J. Pascual Segura

Tutores:

Dr. Antonio Jesús Vizcaíno Torres

Dr. Francisco Javier Alarcón López

Departamento de Biología y Geología. Área de Zoología

Curso 2020/2021

Convocatoria julio 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi tutor del trabajo fin de grado D. Francisco Javier Alarcón López, no solo por darme la oportunidad y la confianza de poder participar en este proyecto y permitirme formar parte de este maravilloso grupo de investigación, sino también por su labor como docente a lo largo de estos años.

Agradecer por supuesto a mi cotutor D. Antonio Jesús Vizcaíno Torres, por todo lo que me ha enseñado, tanto en la carrera como durante la realización del proyecto, por su infinita paciencia y toda la ayuda sin la cual no podría haber realizado este proyecto. Jamás podré agradecerle todo lo que ha hecho por mí.

También agradecer a Dña. María Isabel Sáez Casado y a D. Tomás Francisco Martínez Moya todo lo que me han enseñado en la carrera además de su apoyo y ayuda.

No me olvido del resto de personas maravillosas con los que he compartido laboratorio, que me han hecho sentir como en casa, me refiero a vosotros, Jorge, Luis y, venga, tú también Germán.

Por supuesto no podía continuar los agradecimientos sin hacer una mención muy especial a una persona que por desgracia ya no está entre nosotros pero que ha sido fundamental y ha hecho mella tanto en mi como el resto de los compañeros de la carrera por su forma de ser, su gran corazón y el cariño que nos mostro a todos y cada uno de nosotros en la carrera, me refiero a D. Joaquín Moreno Casco. Siempre te recordaremos y te llevaremos con nosotros allá donde estés, descansa en paz.

Y, por último, agradecer a la que espero que algún día sea mi compañera de laboratorio, al espejo donde me miro y a la persona que ojalá algún día sea capaz de estar a la altura. Sí, me refiero a ti Alba Galafat Díaz, o como me gusta llamarla cariñosamente “machanga”. De verdad que no tengo palabras para agradecerte lo muchísimo que has hecho y haces por mí, no he podido tener más suerte de cruzarme contigo, cualquier comentario positivo hacía ti se queda corto, eres simplemente maravillosa. Te estoy eternamente agradecido.

Este trabajo de investigación se ha realizado en el marco de los proyectos AquaTech4Feed (PCI2020-112204) BLUEBIO-ERAMET-cofund, DORALGAE (RTI2018-096625-B-C31) y ACUDES (AGL-2017-83260R) financiados por la Agencia Estatal de Investigación (Ministerio de Ciencia e Innovación) y los fondos FEDER.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. Situación actual de la acuicultura.....	6
3.2. La acuicultura en España. Principales especies producidas.	7
3.3. La lisa (<i>Chelon labrosus</i>) como especie potencialmente cultivable.	7
3.4. La alimentación de los peces de acuicultura.	9
3.4.1. Papel de las microalgas en nutrición acuícola.....	9
3.4.1. Las microalgas del género <i>Chlorella</i>	10
3.4.2. Problemática del empleo de microalgas en acuicultura.	10
4. OBJETIVOS	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la hidrólisis de la proteína de la microalga <i>C. fusca</i> por las proteasas digestivas de lisa (<i>Chelon labrosus</i>) y lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	13
5.1.1. <i>Chlorella fusca</i>	13
5.1.2. Preparación de extractos enzimáticos de <i>C. labrosus</i> y <i>D. labrax</i>	13
5.1.3. Simulación digestiva <i>in vitro</i> con enzimas intestinales de pez.	13
5.1.4. Seguimiento de la hidrólisis enzimática <i>in vitro</i> con enzimas digestivas de pez.	14
5.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la inclusión de <i>C. fusca</i> en piensos para lisa (<i>C. labrosus</i>).	14
5.2.1. Pienso experimentales.....	14
5.2.2. Animales y diseño experimental	15
5.2.3. Toma de muestras biológicas.	16
5.2.4. Determinación de la actividad enzimática de los extractos digestivos.	16
5.2.5. Visualización de la actividad proteasa alcalina mediante electroforesis SDS-PAGE.	17
5.2.6. Análisis histológico.	18
5.2.7. Estudio de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido.	18
5.3. Análisis estadístico	19
6. RESULTADOS	20
6.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la hidrólisis de la proteína de <i>Chlorella fusca</i> por las proteasas de lisa y lubina.	20
6.2. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de la inclusión de <i>C. fusca</i> en piensos para juveniles de lisa.	22
6.2.1. Parámetros zootécnicos.	22
6.2.2. Evaluación de las actividades enzimáticas digestivas	22
6.2.3. Estudio histológico del intestino.	24
6.2.4. Estudio de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido.	25
7. DISCUSIÓN.....	27
8. CONCLUSIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. RESUMEN

El presente trabajo se centra en la utilización de la microalga *Chlorella fusca* como un potencial ingrediente en la elaboración de piensos para juveniles de lisa (*Chelon labrosus*). La primera parte del trabajo ofrece una evaluación inicial de la hidrólisis *in vitro* de las proteínas presentes en la biomasa liofilizada de la microalga por las proteasas digestivas de lisa y lubina (*Dicentrarchus labrax*). La susceptibilidad de la proteína de esta microalga para ser hidrolizada por las enzimas digestivas de estas dos especies de peces se evaluó mediante la caracterización secuencial de los productos de hidrólisis utilizando un análisis electroforético, y también se cuantificó la concentración de aminoácidos y de azúcares reductores liberados al medio de reacción. Los datos obtenidos tras las simulaciones *in vitro* mostraron que tiene lugar una hidrólisis eficiente de la proteína de *C. fusca* por las proteasas intestinales de lisa y lubina, si bien se observó mayor eficiencia en la digestión simulada en el caso de las enzimas digestivas de la lisa, llegándose a alcanzar valores de degradación proteica superiores al 80%.

En una segunda fase, se evaluó si la inclusión de un 15% de biomasa de *C. fusca* en el pienso resulta adecuada para la alimentación de los juveniles de lisa (*C. labrosus*) a través de un ensayo de crecimiento que tuvo una duración de 90 días. Al final del ensayo de alimentación se tomaron muestras biológicas para determinar la actividad de las enzimas digestivas y evaluar la estructura de la mucosa intestinal mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM). Los resultados revelaron que los peces alimentados con un 15% de *C. fusca* mostraron mayores niveles de actividad proteasa alcalina, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina que los animales alimentados con la dieta control que no incluye microalgas. Por su parte, el análisis histológico del intestino reveló que la inclusión de *C. fusca* redujo el grosor de la lámina propia y de las capas de serosa y muscular, mientras que la longitud de las vellosidades fue significativamente mayor en los peces alimentados con la dieta suplementada con microalgas. Además, el estudio ultraestructural reveló un aumento significativo del área apical de los enterocitos en peces alimentados con microalgas. En general, los resultados obtenidos confirman la utilidad de microalga *C. fusca* para ser utilizada como ingrediente en piensos para lisa, dado el elevado grado de hidrólisis observado en los ensayos de simulación digestiva, y por sus efectos positivos sobre la funcionalidad digestiva en esta especie de pez.

2. ABSTRACT

This work focused on the use of the microalga *Chlorella fusca* as potential ingredient in formulated feeds for thick-lipped mullet (*Chelon labrosus*). The first part of the work offers an initial evaluation about the *in vitro* protein hydrolysis of the freeze-dried microalgal biomass by digestive proteases of thick-lipped mullet and seabass (*Dicentrarchus labrax*). The susceptibility of microalgal protein to be hydrolysed by fish digestive enzymes has been assessed by sequential characterization of the hydrolysis products using electrophoretic analysis, and the determination of total amino acids and reducing sugars released during the digestive simulation. The results obtained at the end of the *in vitro* simulation revealed an efficient hydrolysis of the *C. fusca* protein by intestinal proteases of thick-lipped mullet and seabass, although the highest hydrolysis values were obtained for *C. labrosus*, reaching values higher than 80%.

In a second phase, whether the dietary inclusion of 15% of *C. fusca* is suitable for feeding thick-lipped mullet (*Chelon labrosus*) in a 90-day feeding trial was assessed. At the end of the feeding trial biological samples were withdrawn in order to determine digestive enzyme activities and evaluation of intestinal mucosa structure by optical and scanning electron microscopy (SEM). Results revealed that fish fed 15% *C. fusca* showed higher alkaline protease, leucine aminopeptidase and alkaline phosphate activity levels than animal fed the microalgae-free control diet. Histological analysis of intestine revealed that dietary inclusion of *C. fusca* reduced the thickness of the lamina propria and the serosa and muscularis layers, while villi length was significantly higher in fish fed the microalgae-supplemented diet. Finally, the ultrastructural study revealed a significant increase of the enterocyte apical area in fish fed on the microalgae-enriched diet. Overall, the results obtained confirmed the usefulness of the microalgae *C. fusca* as dietary ingredient in feeds for thick-lipped mullet according to the high protein hydrolysis obtained in the *in vitro* digestive simulation, and the positive effects observed on gut functionality in juvenile fish.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Situación actual de la acuicultura.

De acuerdo con el último informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (FAO, 2020) la producción acuícola mundial alcanzó otro récord histórico de 114,5 millones de toneladas de peso vivo en 2018, de las cuales un total de 82,1 millones de toneladas fueron de animales acuáticos, representando el 46% de la producción total, frente al 25,7% obtenido en el año 2000. De esta producción acuícola predominaron los peces (54,3 millones de toneladas) procedentes tanto de la acuicultura continental (47 millones de toneladas), como de la acuicultura marina y costera (7,3 millones de toneladas), seguidos de los moluscos, sobre todo bivalvos (17,7 millones de toneladas), crustáceos (9,4 millones de toneladas), invertebrados marinos (435.400 toneladas, 2.000 millones de USD), y otras especies (501.000 toneladas) (Figura 1).

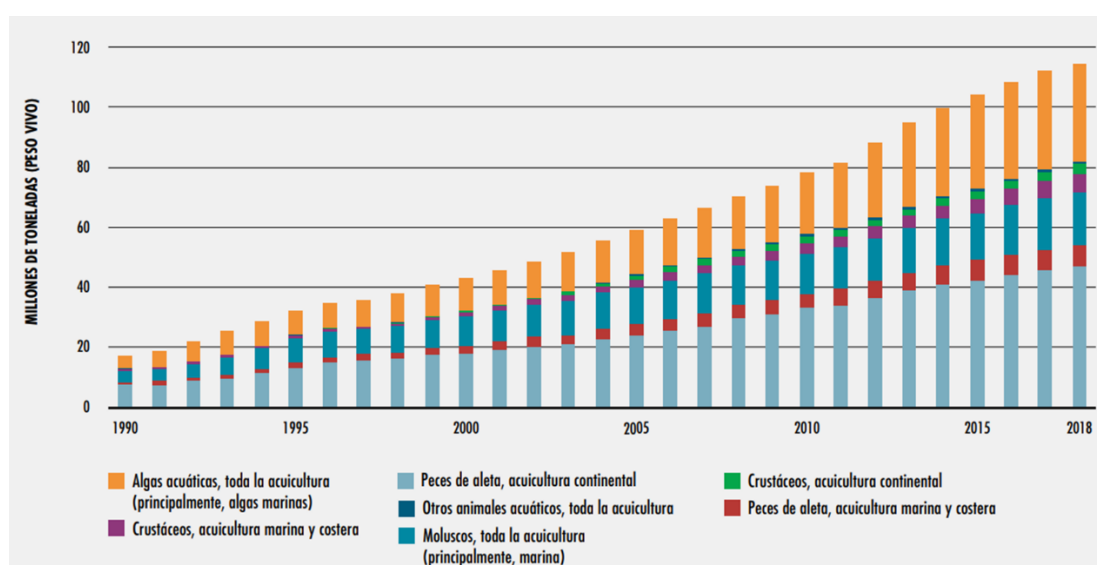


Figura 1. Producción acuícola mundial de animales marinos y algas. Fuente: FAO, 2020.

La mayor parte de la acuicultura mundial se realiza en Asia, concretamente el 91,8 %, como también es el continente mayoritario en pesca (51,3 %). El resto de la producción de acuicultura se distribuye por América (3,3 %), Europa (2,7%), África (2,0 %) y Oceanía (0,2 %) (APROMAR, 2020).

Se prevé que la producción acuícola alcance los 109 millones de toneladas en 2030, lo que supone un aumento del 32% (26 millones de toneladas) con respecto a 2018 (82,1 millones de toneladas). Este incremento viene ligado a distintos desafíos estratégicos relacionados entre sí que revisten importancia a nivel mundial, regional y local. En este sentido, se prevé que el crecimiento demográfico y económico, junto con otros factores relacionados con los adelantos tecnológicos y la diversificación de la dieta, crearán un aumento de la demanda de alimentos, y en particular de productos de origen animal, incluido el pescado (FAO, 2020).

3.2. La acuicultura en España. Principales especies producidas.

A nivel nacional, la producción acuícola alcanzó en 2018 las 348.891 toneladas, con un valor de mercado de 452,9 millones de euros (APOROMAR, 2020). Entre las principales especies producidas en nuestro país se encuentra el mejillón (261.513 toneladas), seguido por la lubina (27.335 toneladas), la trucha arco iris (18.955 toneladas), la dorada (13.521 toneladas), el rodaballo (8.258 toneladas), la corvina (3.650 toneladas) y el lenguado (1.651 toneladas), así como otras especies de interés como la anguila, el besugo y la seriola.

Además, en los últimos años se está trabajando en la incorporación de otras especies de peces marinos como la urta (*Sparus auriga*), el pargo (*Pagrus pagrus*), el besugo (*Pagellus bogaraveo*), el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*), el dentón (*Dentex dentex*), la seriola (*Seriola dumerili*) y el mero (*Epinephelus marginatus*) con el objetivo de mejorar la calidad y diversidad de productos que se ofrecen al consumidor. Por tanto, el primer paso es ampliar la variedad de especies ofertadas por la acuicultura, esta medida permitiría reducir los riesgos propios de los monocultivos. Pero la solución no está en buscar especies que sustituyan a las actuales, sino buscar la diversificación de especies cultivadas. Mediante dos estrategias principales, i) desarrollar especies zootécnicamente óptimas para producir una gran cantidad de biomasa en poco tiempo, que sean especies capaces de crecer rápido y que alcancen tamaños grandes (4-6 kg) o muy grandes (20-50 kg), además de poseer una anatomía que facilite el procesado y la industrialización. Ej: seriola, dentón o corvina, y ii) desarrollar especies conocidas y apreciadas por los consumidores pero que sean escasas por su sobreexplotación pesquera o exigentes desde un punto de vista zootécnico en cuanto a su sistema de producción, lo que no permite una producción a gran escala, como son peces de hábitos sedentarios o muy dependientes del fondo, como los peces planos, los salmonetes y las gallinetas.

Además, en el cultivo de una nueva especie acuícola se tienen que dar una serie de requisitos que aseguren la viabilidad del proceso productivo, como son una buena adaptabilidad a la cautividad, crecimiento rápido en cultivo intensivo, amplio conocimiento sobre los requisitos tanto biológicos como zootécnicos para desarrollar su cultivo, un alto precio de mercado y una alta demanda comercial.

3.3. La lisa (*Chelon labrosus*) como especie potencialmente cultivable.

Chelon labrosus (Risso, 1827), conocida en Andalucía como mújol, lisa o lisa (Figura 2), es un pez teleosteo marino perteneciente a la Familia Mugilidae, Orden Perciformes, Subclase Actinopterygii, Clase Osteichthyes.

La comercialización de esta especie está muy bien establecida en el Mediterráneo (Soliman *et al.*, 2016). Además de su carne, las huevas de la lisa son muy apreciadas en la industria alimentaria de países como Italia, Grecia o Japón, donde se salan y se secan y pueden llegar a precios en torno a los 230 €/kg (Vallainc *et al.*, 2017), además es un mercado internacional que se está expandiendo alrededor de la zona del Mediterráneo.



Figura 2. *Chelon labrosus* (Risso, 1927). Fuente: www.scanpodsters.com.

Su interés como especie acuícola viene determinado por varias características, entre las que destaca su rápido crecimiento, y su gran resistencia frente a variaciones ambientales. Además, su naturaleza eurihalina y euri térmica permite cultivarlos tanto en agua dulce, salobre o marina y en amplios rangos de temperatura, incluso en policultivo con otras especies marinas (lubina o dorada), y de agua dulce (tilapia o carpa) (Crosetti, 2016). Por otro lado, su perfil omnívoro con tendencia herbívora es otro de los aspectos más importantes que determinan su potencial como especie acuícola. De hecho, se considera que el cultivo de especies herbívoras u omnívoras en lugar de carnívoras es un factor clave para incrementar la productividad en acuicultura ya que son especies de rápido crecimiento y fáciles de alimentar. Al igual que en el resto de mugílidos, los ejemplares de *C. labrosus* experimentan una marcada modificación del régimen alimentario a lo largo de su desarrollo que da lugar a la aparición de un aparato enzimático-digestivo adecuado para la digestión del material vegetal (Pujante, 2019), lo que permitiría su alimentación con piensos de coste razonable.

Hasta la fecha, poco se conoce acerca de las necesidades nutricionales de los mugílidos. En general, la mayoría de los peces herbívoros y omnívoros evaluados hasta la fecha requieren entre un 25 y un 35% de proteína cruda en la dieta mientras que en las especies carnívoras se alcanzan valores comprendido entre un 40 y 55% (Lovell, 2000). Si se tiene en cuenta que los ejemplares juveniles se alimentan principalmente de detritos y materia orgánica, se espera que presenten unas necesidades de proteína inferiores a las que presentan las especies carnívoras (Carvalho et al., 2010). Estudios previos revelaron que la inclusión de entre un 30-40% de proteína en la dieta da como resultado una alta tasa de eficiencia proteica, sin embargo, cuando el nivel de proteínas aumenta en relación con el contenido energético del alimento, puede dar lugar a una reducción en la tasa de crecimiento, así como un aumento de la excreción de amoníaco (McGoogan y Gatlin III, 1999; Carvalho et al., 2010).

En este sentido, son numerosos los estudios que se centran en el ámbito nutricional ya que se considera que el desarrollo de piensos formulados específicos, así como de pautas de alimentación acordes con sus necesidades nutritivas es un factor clave para su futura adaptación a la cría en cautividad.

3.4. La alimentación de los peces de acuicultura.

La alimentación de los peces de cultivo se considera un factor clave que va a determinar el éxito o fracaso de esta industria. El alimento es el factor económico de mayor incidencia en los costes de producción (Madrid *et al.*, 2009), por lo que una óptima utilización de los nutrientes resulta esencial para alcanzar un desarrollo sostenible de la acuicultura.

Es conocido que tanto las harinas como los aceites de pescado juegan un papel fundamental en la formulación de piensos para acuicultura debido a su equilibrado contenido en nutrientes, su digestibilidad, palatabilidad y sus ventajas para el procesado de los piensos (de la Higuera y Cardenete, 1993). Sin embargo, el constante crecimiento de la acuicultura y el consiguiente aumento de la demanda de estos ingredientes han provocado un aumento significativo de los precios durante la última década (1.120-1.730 y 2.000 -2,200 USD por tonelada de harina y aceite de pescado, respectivamente-HAMMERSMITH Marketing Ltd, septiembre de 2020) lo que a su vez ha llevado a un incremento de los costes de producción del pienso (Naylor *et al.*, 2009).

A pesar de que en los últimos años las tasas de inclusión de harina y aceite de pescado en los alimentos acuícolas se han reducido progresivamente, industria de la acuicultura todavía depende en gran medida de la harina y el aceite de pescado como ingredientes habituales de los piensos (Yadav *et al.*, 2020). Por lo tanto, la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas y lípidos que pudieran reemplazar total o parcialmente a este insumo en la elaboración de piensos acuícolas sigue siendo un desafío para la acuicultura actual (Yarnold *et al.*, 2019).

3.4.1. Papel de las microalgas en nutrición acuícola.

Desde la década de los 80, las microalgas han desempeñado un papel importante en alimentación acuícola, pero ha sido durante los últimos 25 años cuando ha surgido un mayor interés por el uso de estos organismos unicelulares como potencial alternativa a las harinas y aceites de pescado debido principalmente a su elevado valor nutricional, rápido crecimiento y capacidad antioxidante (Roy y Pal, 2015).

Desde un punto de vista nutricional, las microalgas pueden ser utilizadas como fuente de proteína, o como aporte complementario de lípidos, vitaminas, carotenoides y energía. De hecho, son numerosos los estudios que han evaluado satisfactoriamente los efectos de su inclusión en piensos para peces de acuicultura, destacando efectos positivos sobre el crecimiento y la utilización del alimento, sobre el metabolismo lipídico o sobre la funcionalidad digestiva del animal (véase revisión de Shah *et al.*, 2018).

Su composición química ha sido previamente estudiada y se caracteriza por presentar un elevado contenido en proteína (30-55% en materia seca, MS), entre un 20-50% de lípidos (Chisti, 2007) y un 5-35% de hidratos de carbono (Percival and Turvey, 1974). En general, presentan un contenido en aminoácidos equilibrado, similar al encontrado en otros ingredientes comúnmente utilizados en alimentación acuícola (Becker, 2007), y un adecuado perfil de ácidos grasos caracterizado por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados como el araquidónico

(ARA, 20:4n-6), el eicosapentaenoico (EPA; 20:5n3) y el docosahexaenoico (DHA; 22:6n3) (Brown, 2002).

Además de su valor nutricional, las microalgas presentan otras ventajas de tipo tecnológico (rápido crecimiento en una amplia gama de hábitats, bajas necesidades nutricionales, disponibilidad) que las convierten en un potencial recurso para la elaboración de piensos de acuicultura (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

3.4.1. Las microalgas del género *Chlorella*.

El género *Chlorella* (Beijerinck, 1890), corresponde a algas verdes unicelulares de agua dulce pertenecientes al filo Chlorophyta. Se caracterizan por poseer una alta tasa de crecimiento y ser muy resistente a condiciones variables de temperatura, luz, pH, CO₂ y concentración de nutrientes (Kotrbaček *et al.*, 2015). Muchas especies pertenecientes al género *Chlorella* son eurihalinas, pero los límites de tolerancia de las especies varían considerablemente, sobre todo las que se encuentran distribuidas en ecosistemas costeros como las lagunas salinas y pozas efemerales, las cuales están sujetas a cambios de salinidades, donde adquiere importancia su capacidad de adaptación para sobrevivir en tales ambientes (Kirst, 1989; Adenan *et al.*, 2013; Emad *et al.*, 2015). Desde un punto de vista nutricional, las microalgas del género *Chlorella* presentan un elevado contenido en proteína (hasta un 60% en peso seco, DM) con un adecuado contenido en aminoácidos esenciales cuya composición se asemeja a las proteínas de origen animal (Becker, 2004). Además, presentan un adecuado perfil de ácidos grasos y son fuente de carotenoides, especialmente luteína (Becker, 2013).

Chlorella fusca es un alga esférica o elipsoidal de 4,5-8 micrómetros de largo y 3,5-7 micrómetros de ancho, se caracteriza por un color verde volviéndose marrón con el desarrollo de la edad y un cromatóforo en forma de faja. Además de las interesantes características ya conocidas de las especies del género *Chlorella*, como la alta tasa de crecimiento, el gran tamaño en comparación con otras microalgas y el alto contenido nutricional, *C. fusca* ha mostrado un alto contenido de una variedad de compuestos de alto valor, como en carotenoides, concretamente en luteína (Becker, 2013) y puede acumular un alto contenido en ácidos grasos esenciales como el ácido omega-3 α -linolénico (ALA) o los ácidos linoleico y oleico (Pohl *et al.*, 1971). Además, se ha demostrado su eficacia en la bioadsorción de cadmio y cobre (Wehrheim y Wettern, 1994).

3.4.2. Problemática del empleo de microalgas en acuicultura.

A pesar de las mencionadas ventajas que implican la utilización de microalgas en el cultivo de peces de acuicultura, su utilización va ligada a una serie de retos que deben solventarse para su aplicación a nivel comercial. Entre estos desafíos destacan los aspectos normativos y de

seguridad de las algas para su uso en alimentación acuícola, el precio y su digestibilidad, entre otros.

En este sentido, la accesibilidad y la biodisponibilidad de los nutrientes presentes en las microalgas son factores que determinan el interés de estas materias primas como ingrediente en alimentos acuícolas. Algunas microalgas, como las pertenecientes al género *Chlorella*, presentan una pared celular recalcitrante rica en celulosa y otros componentes que actúa a modo de barrera, dificultando su digestibilidad y la biodisponibilidad de las sustancias de interés presentes en el interior de la célula (Safi *et al.*, 2013; Teuling *et al.*, 2017; Teuling *et al.*, 2019).

La eficiencia de los animales marinos para digerir las paredes celulares depende principalmente de la composición de los carbohidratos de la pared celular y de la existencia de enzimas carbohidrasas en su tracto digestivo. En general, las especies herbívoras y omnívoras poseen una amplia gama de carbohidrasas, pero los peces carnívoros no, y este hecho debe tenerse en cuenta al formular alimentos acuícolas (Shi *et al.*, 2017). A pesar de la presencia de actividad de amilasa intestinal en algunos peces marinos, como la dorada, la falta de celulasas digestivas evita la ruptura de la pared celular de las algas.

Es por esto por lo que numerosos estudios han observado que el potencial teórico de las diferentes microalgas no se refleja necesariamente en una mejora significativa de los índices de crecimiento ni tampoco en los demás parámetros indicativos de condición y estado fisiológico (Cardinaletti *et al.*, 2018). Sin embargo, y a pesar de estos precedentes son escasos los trabajos en los que se evalúa la acción de las enzimas digestivas peces sobre la biomasa microalgal y su capacidad para hidrolizar la proteína de estos productos (Tibbetts *et al.*, 2017; Vizcaíno *et al.*, 2019).

4. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado es evaluar la capacidad de los juveniles de lisa (*Chelon labrosus*) para hidrolizar *in vitro* a la microalga *Chlorella fusca*, y evaluar los efectos de su inclusión en el pienso sobre la funcionalidad digestiva en esta especie de pez.

Este objetivo general se aborda a través de dos objetivos específicos:

- i) evaluar la hidrólisis *in vitro* de la proteína de la microalga *C. fusca* por las proteasas digestivas de lisa y de lubina, esta última utiliza como especie de referencia.

- ii) evaluar los efectos derivados de la inclusión en los piensos de biomasa de la microalga *C. fusca* sobre la actividad de distintas enzimas relacionadas con los procesos de digestión y absorción de nutrientes a nivel intestinal, y sobre la ultraestructura de la mucosa intestinal en la lisa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Evaluación *in vitro* de la hidrólisis de la proteína de la microalga *C. fusca* por las proteasas digestivas de lisa (*Chelon labrosus*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*)

5.1.1. *Chlorella fusca*

Se utilizó biomasa de *C. fusca* cultivada en la plataforma demostrativa de investigación en producción de microalgas (SABANA) ubicada en la Universidad de Almería, en las instalaciones que comparte con el IFAPA en La Cañada de San Urbano (Almería). La biomasa se obtuvo utilizando un sistema piloto empleando un medio de cultivo estandarizado (Borowitzka, 1999) y bajo condiciones controladas de intensidad de luz, fotoperiodo, temperatura, pH y CO₂. La biomasa de microalgas se recolectó por centrifugación y se sometió a un tratamiento de rotura mecánica y posterior liofilización. La biomasa liofilizada se almacenó a -18°C hasta su uso.

5.1.2. Preparación de extractos enzimáticos de *C. labrosus* y *D. labrax*.

Se utilizaron ejemplares de lisa (*C. labrosus*) y lubina (*D. labrax*) proporcionadas por el C.I.F.P. Marítimo Zaporito (San Fernando, Cádiz, España) y Planta de Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz (Puerto Real, Cádiz), respectivamente. Para la obtención de extractos enzimáticos, 10 ejemplares de cada una de las especies citadas se anestesiaron y se sacrificaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. A continuación, se abrió el abdomen, se extrajo el intestino y se agruparon para su posterior homogenización con agua destilada (500 mg mL⁻¹) empleando un potter de vidrio esmerilado. Seguidamente, el homogeneizado se sonicó en frío (4°C) mediante tres pulsos de 10 segundos y se centrifugó durante 12 minutos a 12.000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se repartió en alícuota que se conservaron a -20°C hasta su uso.

A continuación, se determinó la actividad proteasa alcalina siguiendo la metodología descrita por Alarcón *et al.* (1998), usando 5 g L⁻¹ de caseína tamponada en Tris HCl 50 mM (pH 9.0) como sustrato. Una unidad de actividad proteasa (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1µg de tirosina por minuto en la mezcla de reacción, considerando un coeficiente de extinción molar de la tirosina de 0,008 µg⁻¹ mL⁻¹ cm⁻¹.

5.1.3. Simulación digestiva *in vitro* con enzimas intestinales de pez.

La hidrólisis *in vitro* de las proteínas de la microalga *C. fusca* se realizó siguiendo la metodología descrita por Vizcaíno *et al.* (2019). Para la simulación se emplearon reactores encamisados de 10 mL de capacidad conectados entre sí por un sistema de recirculación de agua cuyo objetivo es mantener la temperatura constante a 37°C y en agitación continua.

En cada reactor se suspendió una cantidad conocida de *C. fusca* en tampón Tris-HCl (pH 9,0) proporcionando 80 mg de proteína. La mezcla se mantuvo en agitación durante 15 minutos antes del inicio de la reacción enzimática. Para iniciar la reacción, se agregó un volumen de extracto enzimático de *C. labrosus* y *D. labrax* que proporciona 200 unidades de actividad (U)

proteasa alcalina total, La mezcla de se mantuvo a temperatura y agitación constante durante 90 minutos. Durante el transcurso de la hidrólisis se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 minutos), se detuvo la reacción y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Adicionalmente se realizó un ensayo en blanco en ausencia de extracto enzimático de lisa, o en su caso extracto enzimático de lubina. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.1.4. Seguimiento de la hidrólisis enzimática *in vitro* con enzimas digestivas de pez.

Se evaluó el grado de hidrólisis de las principales fracciones proteicas presentes en la biomasa liofilizada de la microalga mediante electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970), utilizando geles de poliacrilamida al 12% (100 V por gel, 60 minutos). Las muestras se diluyeron previamente (1:1) con tampón de muestra de muestra (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% (p/v) SDS; 10% (v/v) 2-mercaptoetanol; 20% (v/v) glicerol; 0,04% (p/v) azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min con el objetivo de detener la reacción enzimática. En cada gel se incluyeron 5µL de marcador de peso molecular (S-84445 SigmaMarkerTM, St. Louis, USA) y se calculó el peso molecular de cada fracción. El grado de hidrólisis proteica se evaluó mediante análisis densitométrico de los geles, utilizando el software informático myImageAnalysis (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). A continuación, se determinó el Coeficiente de Degradación Proteica (CDP) de acuerdo con la metodología descrita por Alarcón *et al.* (2001).

Adicionalmente, se cuantificó la cantidad de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis enzimática se cuantificó de acuerdo con la metodología descrita por Church *et al.* (1983), usando L-leucina como patrón, así como la concentración de azúcares reductores liberados mediante el método DNS (ácido dinitrosalicílico) descrito por Miller (1959), utilizando glucosa como estándar.

5.2. Evaluación *in vivo* de la inclusión de *C. fusca* en piensos para lisa (*C. labrosus*).

5.2.1. Pienso experimentales.

Se elaboraron dos dietas experimentales isoproteicas (40% en peso seco) e isolipídicas (7% en peso seco) comprendidas por un pienso control (CT), y otro pienso suplementado con un 15% de la microalga *C. fusca* (C-15). Todas las dietas fueron elaboradas por el Servicio Periférico de Dietas Experimentales de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería.

Para la fabricación de los piensos, los ingredientes sólidos se mezclaron utilizando una amasadora Sammic BM-10, de capacidad de 10L (Sammic, Azpeitia, España), a continuación, se les agregaron los ingredientes líquidos y el cloruro de colina diluido. Esta solución se mezcló durante 15 minutos, y se adicionó agua (300 mL kg⁻¹) hasta obtener una masa uniforme. Una vez obtenida la masa, se procedió al granulado con una granuladora Braher® P22-82 (Braher Internacional SA. Andoain, España) para obtener pellets flotantes de 3 mm de diámetro. Finalmente, el secado de los piensos se realizó en una cámara de secado a 30°C, y una vez elaborados, éstos fueron almacenados a -20°C. Los distintos ingredientes empleados para la preparación de los piensos experimentales se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Ingredientes utilizados en la elaboración de los piensos experimentales.

	CT	C-15
Ingredientes (g kg⁻¹ materia seca, MS)		
Harina de pescado LT94 ¹	75	64
<i>C. fusca</i> ²	0	150
Concentrado proteico de guisante ³	75	64
Concentrado proteico de soja ⁴	175	149
Harina de soja	188	159
Harina de girasol	20	20
Gluten de trigo ⁵	60	51
Harina de trigo ⁶	210	170
Almidón de patata	25	25
Aceite de pescado	40	35
Vitaminas y minerales ⁷	10	10
Goma guar	15	15
Composición proximal (g kg⁻¹ MS)		
Proteína bruta	404,5	376,2
Lípidos totales	70,4	68,0
Cenizas	122,9	143,1

Códigos: CT: dieta libre de alga; C-15: 15% de *C. fusca*. ¹(proteína: 69,4%; lípidos: 12,3%), Norsidemel (Bergen, Noruega); ²(proteína: 15,2%; lípidos: 1,1%); ³(proteína: 85%; lípidos: 1,3%); ⁴(proteína: 51,5%; lípidos: 8,0%); ⁵(proteína: 76,0%; lípidos: 1,9%); ⁶(proteína: 12,0%; lípidos: 2,0%); ⁷Premezcla de minerales y vitaminas de acuerdo con Pereira y Oliva-Teles (2003).

5.2.2. Animales y diseño experimental

Para el ensayo de alimentación, se utilizaron 180 ejemplares de lisa (*C. labrosus*) ($84,7 \pm 0,3$ g, peso medio inicial) proporcionados por el C.I.F.P. Marítimo Zaporito (San Fernando, Cádiz, España). Los peces se sometieron a una fase de aclimatación en las instalaciones Centro de Experimentación de Ecología y Microbiología de Sistemas Acuáticos controlados Grice-Hutchinson (CEMYSA) de la Universidad de Málaga (Málaga, REGA ES290670002043). Tras el periodo de aclimatación de 30 días, los peces se distribuyeron aleatoriamente en 6 tanques de fondo plano y 1000 L de capacidad (30 individuos por tanque), y pasaron a ser alimentados con los dos piensos experimentales (CT y C-15) suministrados a razón del 3% de la biomasa total del tanque al día en dos tomas (9:00 y 17:00) durante un periodo de 90 días. El ensayo de alimentación se llevó a cabo en un circuito abierto bajo condiciones controladas (temperatura 17-19°C, fotoperiodo natural, oxígeno $6,8 \pm 0,4$ mg L⁻¹, amonio <0,1 mg L⁻¹, nitritos <0,2 mg L⁻¹ y nitratos <50 mg L⁻¹).

5.2.3. Toma de muestras biológicas.

Al final de ensayo de alimentación, se tomaron 10 ejemplares de cada tanque que fueron anestesiados y sacrificados mediante una incisión en la columna vertebral a la altura de los opérculos de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Se abrió el abdomen de cada pez y se le extrajo el paquete intestinal del cual se separó el intestino. Por un lado, se obtuvieron muestras para la preparación de extractos enzimáticos que fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento posterior. De otro lado, se obtuvieron muestras de 0,5 cm de intestino para su análisis mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM).

5.2.4. Determinación de la actividad enzimática de los extractos digestivos.

Para la determinación de las actividades enzimáticas digestivas se prepararon extractos enzimáticos a partir de las muestras de intestino obtenidas, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 5.1.2.

La actividad proteasa alcalina total se evaluó mediante ensayo de actividad a tiempo final siguiendo la metodología de Alarcón *et al.* (1998) en la que se emplea caseína al 1% (p/v) tamponada en Tris-HCl 100 mM a pH 9 como sustrato. Brevemente, se pre-incubó 1 mL de la solución del sustrato tamponado con extracto intestinal durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción agregando 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v). A continuación, se centrifugaron las muestras (15 minutos, 4°C, 12.000 rpm) y se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro "Thermo Scientific Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer" a 280 nm. Para todas las muestras se incluyó un ensayo blanco al cual se añadió TCA al 20% antes de iniciar la reacción. La actividad se calculó a partir de los valores de absorbancia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot V \cdot 1000 \cdot D}{\text{CEM} \cdot \text{TI} \cdot V_m}; \text{ donde:}$$

Abs min⁻¹ = incremento de absorbancia descontando el blanco,

V = volumen final de reacción en mL,

D = dilución empleada, en caso de que haya sido necesario, de lo contrario vale 1,

CEM = coeficiente de extinción molar de la tirosina (0,008 mL μg⁻¹ cm⁻¹),

TI: tiempo de incubación en minutos,

V_m = volumen de extracto enzimático para cada ensayo.

Los valores obtenidos de sustituir los datos en la ecuación se expresaron en Unidades de actividad (U) g de tejido⁻¹, entendiéndose como una unidad de actividad a la cantidad de enzima que libera 1 μg de tirosina por minuto en la mezcla de reacción, empleando como coeficiente de extinción molar de la tirosina 0,008 mL μg⁻¹ cm⁻¹.

Los niveles de actividad tripsina y quimotripsina se determinaron usando BAPNA 0,5 mM (N- α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) (Erlanger *et al.*, 1961) y SAPNA 0,2 mM (N-succinil-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilida) (Del Mar *et al.*, 1979), respectivamente, ambos en el tampón Tris-HCl 50 mM, 20 mM Cl₂Ca a pH 8,5. La actividad fosfatasa alcalina se ensayó utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato 450 mM tamponado en buffer dietanolamina 1 M, MgCl₂ 1 mM a pH 9,8 (Bergmeyer, 1974), mientras que para la actividad leucina aminopeptidasa se empleó como sustrato L-Leucina-p-nitroanilida 2mM en buffer Tris HCl 100mM, pH de 8,8 (Pfeiderer, 1970).

Dichas actividades se cuantificaron mediante cinética en un lector de microplacas (*Thermo Electron Corporation Multiskan Ex*) a 405nm. En todos los casos se cuantificó el incremento de absorbancia a 405nm en continuo durante un máximo de 15 minutos. La actividad enzimática se calculó como U mL⁻¹ según la ecuación:

$$\text{Actividad (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot V \cdot 1000 \cdot D}{\text{CEM} \cdot V_m}; \text{ donde:}$$

Abs min⁻¹ = incremento de absorbancia,

V = volumen final de reacción en mL,

D = dilución empleada, en caso de que haya sido necesario, de lo contrario vale 1,

CEM = coeficiente de extinción molar de la tirosina (17.800 M cm⁻¹ o 8.800 M cm⁻¹),

V_m = volumen de extracto enzimático para cada ensayo.

Los valores obtenidos de sustituir los datos en la ecuación se expresaron en U g de tejido⁻¹. Para tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa, una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera un μ mol de p- nitroanilida (pNa) por minuto, (coeficiente de extinción 8.800 M cm⁻¹), mientras que para la fosfatasa alcalina, se consideró la cantidad de enzima que libera un μ g de nitrofenol por minuto (coeficiente de extinción molar 17.800 M cm⁻¹). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.2.5. Visualización de la actividad proteasa alcalina mediante electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis SDS-PAGE siguiendo la metodología de Laemmli (1970) empleando geles de poliacrilamida con una concentración del 11% y un tamaño es de 0,75 x 8 x 10 cm. La electroforesis se desarrolló a un voltaje continuo de 200 V (100V por gel) durante 60 min a 4°C.

A continuación, los geles fueron tratados de acuerdo con la metodología descrita por Alarcón *et al.* (1998) con el objetivo de revelar la actividad proteasa presente en los extractos. Brevemente, se lavaron los geles con agua destilada y se incuban durante 30 min a 4°C con una solución de caseína tamponada (pH 9) al 0,75% (p/v). A continuación, los geles fueron transferidos a una solución fresca de caseína y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se retiró la solución de caseína, se lavaron los geles repetidas veces con agua destilada para eliminar toda la caseína sobrante y se fijaron con una solución de TCA al 12% (p/v) durante 30

minutos a 4°C. A continuación, se retiró la solución de TCA, se lavaron los geles con agua destilada y se procedió a su tinción con una solución Coomassie Brilliant Blue R250 en metanol al 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) y agua destilada durante 12 horas. Para desteñir los geles, se empleó la misma solución, pero sin colorante. Al poco tiempo pudo apreciarse una serie de bandas blancas correspondiente a la actividad caseinolítica presenten en el extracto enzimático.

5.2.6. Análisis histológico.

Las muestras de intestino destinadas a microscopía óptica se fijaron en una solución Davidson, se incluyeron en parafina, y cortadas en un microtomo (6 µm). Una vez desparafinadas se tiñeron con hematoxilina-eosina (Martoja y Martoja-Pierson, 1970). Las fotografías de las secciones se realizaron con un microscopio invertido "OLYMPUS IX51" equipado con el software cell^B versión 2.6 (Olympus SoftImaging Solutions GmdH. Muenster, Alemania).

Todas las imágenes obtenidas se analizaron empleando el software Image J (versión 1.52) desarrollado por el National Institute of Health (USA), realizándose al menos 50 mediciones por tratamiento. A partir de las imágenes de óptico se obtuvo información acerca del espesor de las capas, serosa, mucosa y submucosa, altura de los enterocitos, altura y diámetro de las vellosidades y grosor de la lámina propia (Figura 3).

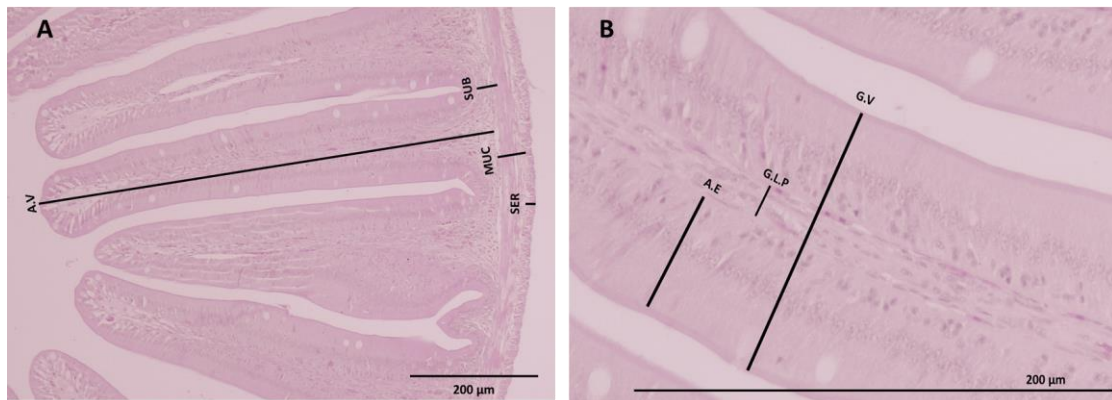


Figura 3. Detalle de la estructura tisular del intestino de los ejemplares de lisa a 100x (A) y 400x (B). Códigos: A.V: Altura de las vellosidades; SER: Capa serosa; MUC: Capa mucosa; SUB: Capa submucosa; G.V: Grosor vellosidades; G.L.P: Grosor de la lámina propia; A.E: Altura enterocito.

5.2.7. Estudio de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido.

Las muestras de intestino destinadas al microscopio de barrido se fijaron en una solución de formaldehído 40 g L⁻¹ en PBS a pH 7,5 durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, las muestras se lavaron con PBS y se deshidrataron progresivamente mediante lavados graduales con etanol cada 20 minutos a concentraciones que van desde el 50% al 100% (v/v). A continuación, se desecaron las muestras sustituyendo el etanol al 100% por CO₂ líquido empleando el desecador

por punto crítico “BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer”, seguidamente se elimina el CO₂ y se traspasan las muestras a un desecador. Una vez desecadas se montaron en los soportes y se fijaron con grafito “PELCO® Colloidal Graphite”. Por último, las muestras se metalizaron con oro empleando la técnica de pulverización catódica utilizando el equipo “BAL-TEC SCD 005 Cool Sputter Coater”. La observación se realizó con un microscopio electrónico de barrido modelo “HITACHI S-3500N” en 10 kV.

Todas las imágenes obtenidas se analizaron empleando el software Image J (versión 1.52) desarrollado por el National Institute of Health (USA), realizándose al menos 50 mediciones por tratamiento. A partir de las imágenes de SEM se evaluó la integridad de la mucosa intestinal mediante análisis visual y se obtuvo información del área apical de los enterocitos (Figura 4).

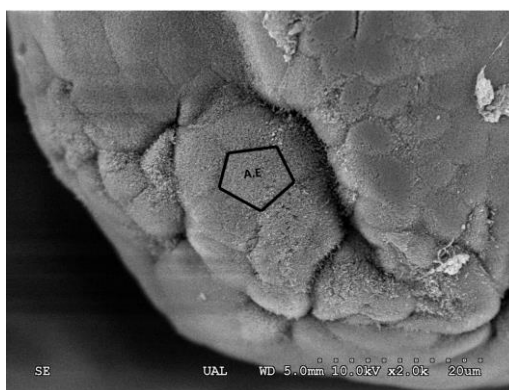


Figura 4. Detalle de la cara apical de los enterocitos del intestino de los juveniles de lisa. Códigos: A.E: Área apical de los enterocitos.

5.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows (Rockville, Maryland, USA). Los datos que presentaron distribución paramétrica fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y sometidos a un test de Tuckey HSD para determinar las diferencias significativas existentes entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$), mientras que los datos con distribución no paramétrica se analizaron mediante un test Kruskal-Wallis y la presencia de diferencias significativas entre medianas se determinó mediante gráficas de cajas y bigotes (Box and Whisker Plot). Los datos en porcentajes fueron normalizados mediante la raíz del arco seno de la observación de forma previa al análisis estadístico. Las diferencias entre las dos dietas experimentales se determinaron mediante la comparación de medias de la prueba t de Student. Se estableció la significación para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación *in vitro* de la hidrólisis de la proteína de *Chlorella fusca* por las proteasas de lisa y lubina.

La Figura 5 muestra la evolución de la hidrólisis proteica de la biomasa de la microalga *C. fusca* por las proteasas digestivas de lisa y lubina. Se evaluó los cambios en la densidad óptica en 8 fracciones de proteína que van desde 29 a 135 kDa. En general, se observó una reducción progresiva de la densidad óptica de las bandas durante los 90 min de ensayo de digestión simulada. En el caso del extracto enzimático de lisa (*C. labrosus*) se observó una degradación de la proteína más acentuada que la observada cuando se utilizó extracto enzimático de lubina (*D. labrax*), llegando a degradar casi por completo algunas fracciones proteicas (60 kDa) que, en el caso de la lubina, se vieron menos afectadas. Cabe destacar que, en ambos casos, las fracciones con un peso molecular de 135 y 29 kDa permanecieron casi inalteradas al final de los 90 min de hidrólisis enzimática.

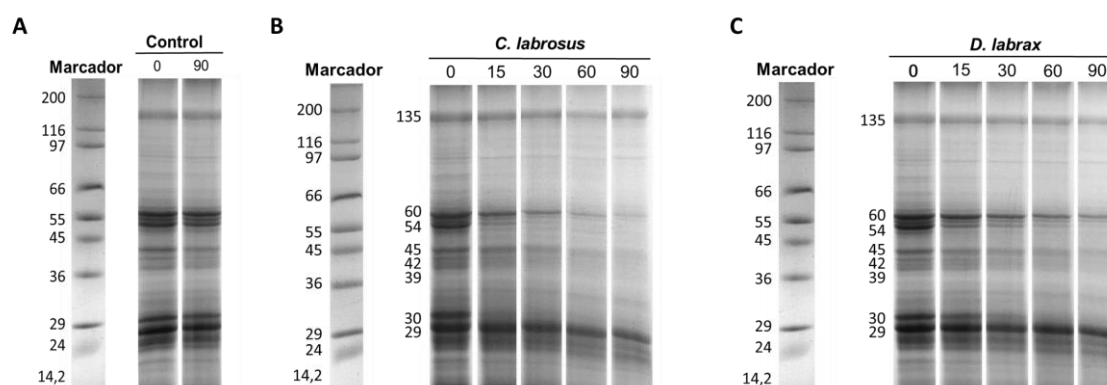


Figura 5. Proteinograma de *Chlorella fusca* obtenido en el ensayo control en ausencia de enzimas de pez a los 0 y 90 minutos (A), y evolución de la hidrólisis de la proteína de la microalga en presencia de las proteasas digestivas de lisa (B) y lubina (C). Las imágenes muestran los geles electroforéticos obtenidos en los distintos tiempos de muestreo de la mezcla de reacción (0, 15, 30, 60 y 90 minutos). Los números que aparecen a la izquierda de los geles indican el peso molecular (kDa) de las principales fracciones proteicas analizadas.

La Figura 6A muestra la evolución de los valores medios del coeficiente de degradación proteica (CDP) durante el transcurso de la hidrólisis. Los resultados pusieron de manifiesto que tanto el extracto intestinal de lisa como el de lubina produjeron una rápida degradación de las proteínas de la microalga en los 30 primeros minutos del ensayo de simulación digestiva con tendencia a mantenerse en los tiempos 60 y 90. A pesar de que la evolución fue similar en ambas especies, en lisa (*C. labrosus*) se obtuvieron valores de CDP significativamente mayores a los observados en el caso de *D. labrax* ($p < 0,05$), llegándose a alcanzar valores de degradación superiores al 80% al final de la simulación digestiva *in vitro*.

La liberación de aminoácidos también fue progresiva con independencia del extracto enzimático utilizado (Figura 6B). En ambos casos se observó una liberación progresiva de aminoácidos durante los 90 minutos de hidrólisis enzimática. Al final del ensayo, la liberación de aminoácidos

fue significativamente mayor cuando se utilizó extracto intestinal de lisa, alcanzándose una cantidad total de aminoácidos liberados superior al 25% ($p < 0,05$).

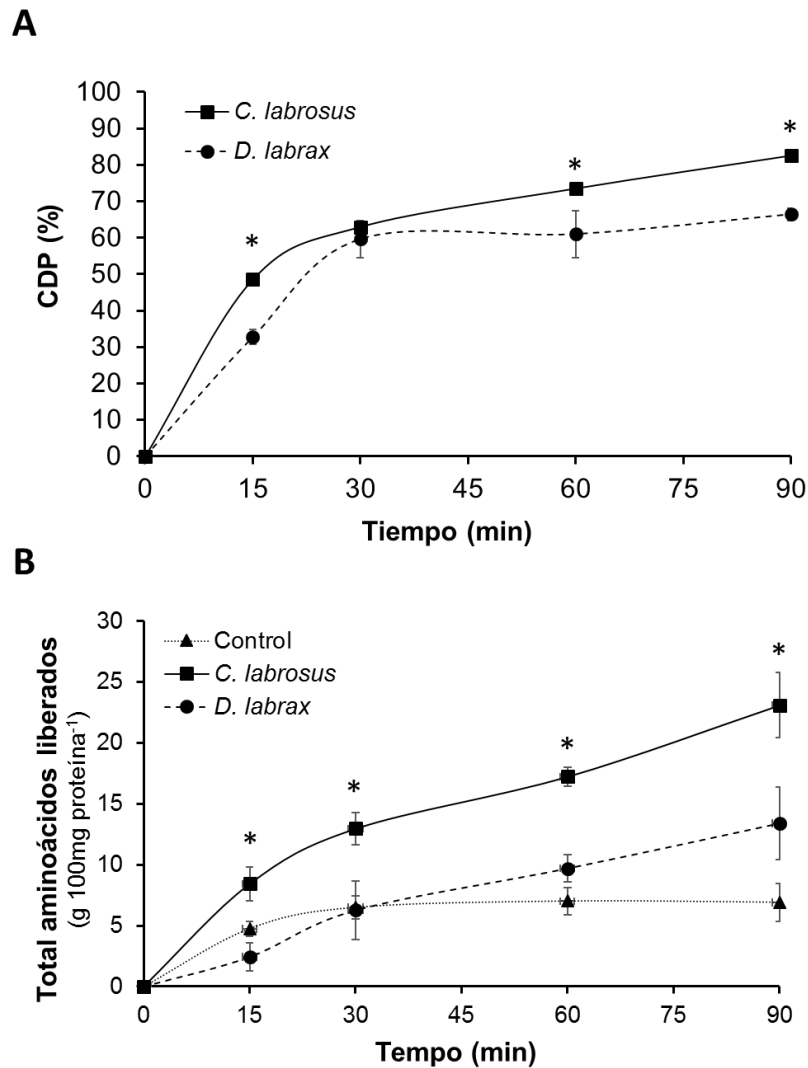


Figura 6. Evolución del coeficiente de degradación proteica (CDP) (A) y de la liberación de aminoácidos al medio (B) durante la hidrólisis de *C. fusca* por los extractos enzimáticos de lisa y lubina. En B se incluyen los valores de aminoácidos libres obtenidos en un ensayo control realizado sin enzimas de pez. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las dos especies de pez ($p < 0,05$).

Por último, la Figura 7 representa concentración de azúcares reductores al inicio y al final de la simulación digestiva con enzimas de pez. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de azúcares reductores al final de la hidrólisis enzimática con enzimas digestivas de lisa fue significativamente mayor a la obtenida cuando se empleó el extracto enzimático de lubina, si bien en ambos casos se observó que hay una escasa degradación de la pared celular de la microalga obteniéndose valores inferiores a 2g de equivalentes de glucosa libre por cada 100g de biomasa de microalgas al final del ensayo *in vitro*.

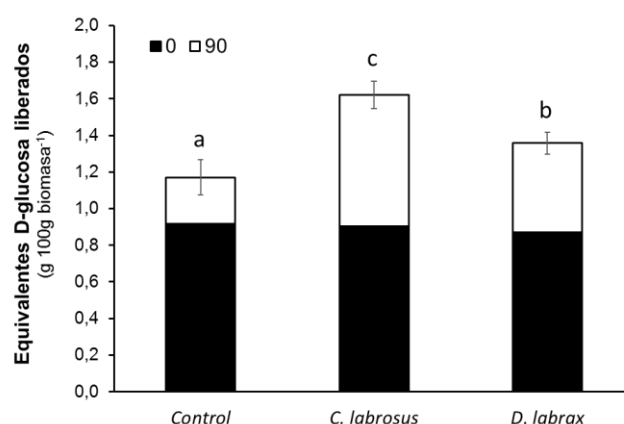


Figura 7. Cuantificación de los azúcares reductores (g de equivalentes de glucosa por 100 g) liberados al medio de reacción al inicio (0 min) y final (90 min) de la digestión *in vitro* de *Chlorella fusca* en presencia de las enzimas digestivas de lisa y lubina.

6.2. Evaluación *in vivo* del efecto de la inclusión de *C. fusca* en piensos para juveniles de lisa.

6.2.1. Parámetros zootécnicos.

Los datos biométricos determinados en las lisas alimentadas con las dietas al final del ensayo se muestran en la Tabla 2. Los resultados obtenidos indican que tanto el peso total como la longitud de los peces fueron significativamente mayores en el grupo alimentado con el pienso suplementado con microalgas.

Tabla 2. Medidas e índices biométricos determinados en lisas (*C. labrosus*) alimentadas con pienso control y con el 15% de harina de *C. fusca* durante 90 días (valores medios \pm SD, n=15).

	CT	CH-15	<i>p</i>
Peso inicial (g)	84,5 \pm 0,6	85,0 \pm 0,5	n.s.
Peso final (g)	144,8 \pm 5,1 a	158,8 \pm 3,6 b	0,019
Longitud inicial (cm)	18,0 \pm 0,1	17,9 \pm 0,2	n.s.
Longitud final (cm)	21,6 \pm 0,4 a	22,3 \pm 0,2 b	0,041

Códigos: CT: Control; C-15: 15% de inclusión de *Chlorella fusca*. Valores expresados como media \pm SD. Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.2. Evaluación de las actividades enzimáticas digestivas.

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos para cada una de las actividades enzimáticas evaluadas al final del ensayo de alimentación. En general, se observó que la inclusión de *C. fusca* no ejerció efectos negativos sobre los niveles de actividad de las enzimas. Se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de actividad proteasa alcalina total en los peces

alimentados con un 15% de *C. fusca*. Sin embargo, no se observaron efectos sobre los niveles de actividad tripsina y quimotripsina. En lo que respecta a las enzimas procedentes de secreción intestinal, la inclusión de *C. fusca* en el pienso ejerció un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los niveles de actividad leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, observándose un incremento de ambas actividades en los ejemplares alimentados con la dieta C-15.

Tabla 3. Actividades enzimáticas digestivas (U g de tejido⁻¹) en los extractos de intestino de los ejemplares de lisa al final del ensayo de alimentación.

	CT	C-15	<i>p</i>
Proteasa alcalina	490,31 ± 105,13 a	763,20 ± 173,66 b	0,002
Tripsina	0,16 ± 0,05	0,21 ± 0,04	0,056
Quimotripsina	2,88 ± 0,90	3,01 ± 0,76	0,753
Leucina aminopeptidasa	0,36 ± 0,07 a	0,46 ± 0,07 b	0,008
Fosfatasa alcalina	3,72 ± 0,45 a	5,21 ± 0,74 b	<0,001

Códigos: CT: Control; C-15: 15% de inclusión de *Chlorella fusca*. Valores expresados como media ± SD (n=9). Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Adicionalmente, el zimograma reveló que la inclusión del *C. fusca* no alteró el patrón proteolítico intestinal en los juveniles de lisa, observándose un mismo patrón de bandas activas en ambos grupos de peces (Figura 8).

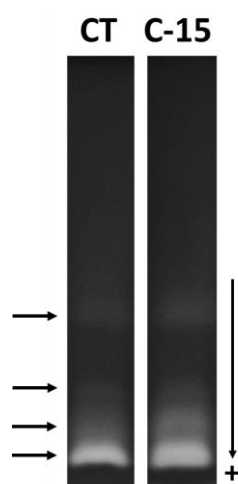


Figura 8. Substrato-SDS-PAGE de los extractos intestinales de los juveniles de *C. labrosus* alimentados con las dietas experimentales. Códigos: CT: Control; C-15: 15% de inclusión de *Chlorella fusca*.

6.2.3. Estudio histológico del intestino.

La Figura 9 muestra la estructura intestinal de los juveniles de lisa a tres niveles de magnificación (40x en la serie de imágenes con escala de 200 μm , 100x con escala de 200 μm y 400x con escala de 100 μm). El análisis visual de las imágenes obtenidas mostró que la mucosa intestinal posee una apariencia normal. La observación de la mucosa a menor aumento (40x) mostró que las vellosidades intestinales eran abundantes en ambos tratamientos, con una longitud y diámetro que cubre casi la totalidad de la luz intestinal. A mayor aumento (100x y 400x) se comprobó que la mucosa presenta una apariencia normal, con los núcleos de los enterocitos alineados en la zona basal, confirmando la característica estructura en forma de “dedos en guante”. El análisis morfométrico de las imágenes (Tabla 4) reveló la influencia de la inclusión de *C. fusca* sobre la estructura de la mucosa intestinal. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en la altura de las vellosidades en los peces alimentados con un 15% de inclusión de *C. fusca* ($p < 0,05$), mientras que el diámetro de la vellosidad y la altura de los enterocitos fue similar en ambos tratamientos. Adicionalmente, se observó que la inclusión de la biomasa de microalgas indujo una reducción significativa del espesor de las capas serosa y muscular, así como del grosor de la lámina propia, respecto a los valores obtenidos en los peces alimentados con la dieta CT.

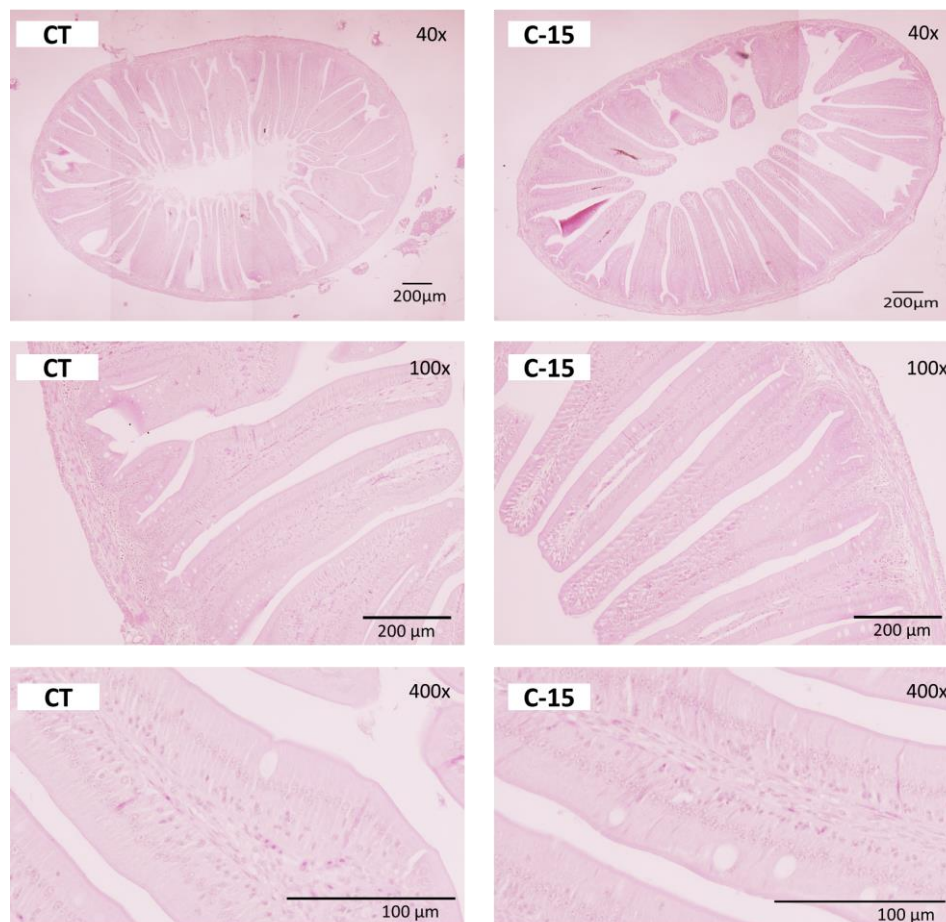


Figura 9. Detalle de la estructura tisular del intestino de los ejemplares de lisa alimentados con la dieta CT y C-15 (15% de inclusión de *C. fusca*).

Tabla 4. Resultados del análisis morfométrico realizado en la mucosa intestinal de los ejemplares de lisa alimentados con los piensos experimentales.

	CT		C-15		p
Altura vellosidad (μm)	677,39 ± 62,28	a	728,30 ± 52,68	b	<0,001
Diámetro vellosidad (μm)	120,33 ± 21,05		112,01 ± 13,53		0,196
Altura enterocito (μm)	40,93 ± 4,25		41,55 ± 2,63		0,3858
Grosor serosa (μm)	31,22 ± 5,90	b	20,97 ± 2,65	a	<0,001
Grosor capa muscular (μm)	33,75 ± 3,33	b	30,63 ± 2,53	a	<0,001
Grosor submucosa (μm)	29,75 ± 3,27	b	24,39 ± 1,63	a	0,0237
Grosor lamina propria (μm)	39,41 ± 5,13	b	33,32 ± 3,90	a	<0,001

Códigos: C-15: 15% de inclusión de *C. fusca*. Valores expresados como media ± SD (n=50). Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.2.4. Estudio de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido.

El análisis visual de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó la ausencia de daños o alteraciones en la integridad de la cara apical de los enterocitos (Figura 10). Los resultados obtenidos tras el análisis morfométrico revelaron un incremento significativo en el área apical de los enterocitos en los peces alimentados con la dieta C-15 ($31,49 \pm 4,43 \mu\text{m}^2$) respecto a los ejemplares alimentados con la dieta libre de microalgas ($18,21 \pm 5,78 \mu\text{m}^2$) (Figura 11).

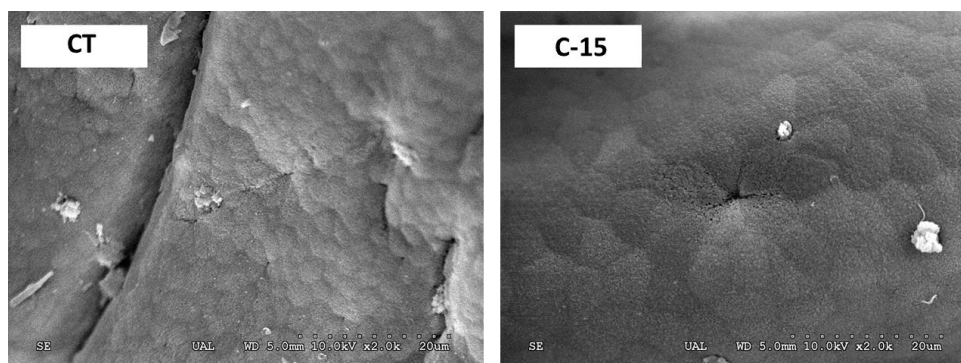


Figura 10. Detalle de la estructura tisular del intestino de los ejemplares de lisa alimentados con la dieta CT y C-15 (15% de inclusión de *C. fusca*). Escala: 20 μm.

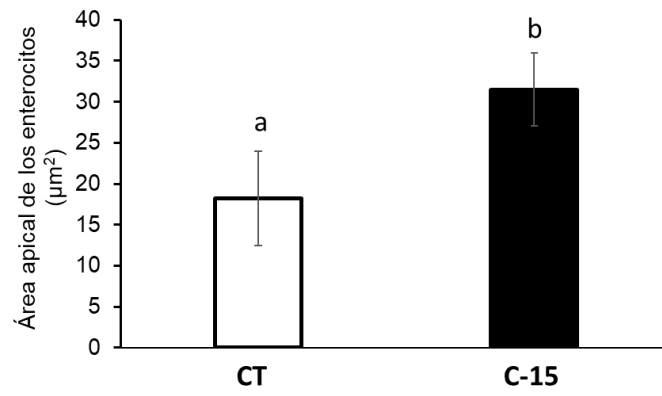


Figura 11. Área apical de los enterocitos de los ejemplares de lisas alimentados con las dietas experimentales. Códigos: CT (Control, libre de microalgas) y C-15 (15% de inclusión de *C. fusca*). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos.

7. DISCUSIÓN

Actualmente, la alimentación sigue siendo uno de los principales retos de la acuicultura dada la alta dependencia de insumos derivados de las pesquerías (harinas y/o aceites de pescado). La mayoría de las especies acuicultivadas presentan una alimentación carnívora, sin embargo, durante los últimos años ha predominado la tendencia hacia el cultivo de especies omnívoras y/o herbívoras, como es el caso de algunas especies pertenecientes a la familia Mugilidae lo que permite incrementar los porcentajes de sustitución de harina de pescado por otros ingredientes alternativos de origen vegetal, disminuyendo así los costes de producción de las empresas acuícolas y preservando la biodiversidad de los ecosistemas marinos (Wassef *et al.*, 2001; Pujante, 2019). En este sentido, es muy importante tener en cuenta que reemplazar las harinas y aceites de pescado no es solo sustituir la proteína o los lípidos, sino que además deben aportar otros nutrientes de vital importancia para el correcto desarrollo del animal como nucleótidos, ácidos grasos n-3, minerales, colesterol, vitaminas, carotenoides y otros compuestos bioactivos de interés.

Durante los últimos años, la inclusión de microalgas en piensos para acuicultura ha despertado un gran interés ya sea para su incorporación como ingrediente de naturaleza proteica (Rahimnejad *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2019) o como aditivo a bajos niveles de inclusión (Ayala *et al.*, 2020; Galafat *et al.*, 2020). Desde un punto de vista nutricional, las microalgas pueden ser utilizadas como fuente de proteína y aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, carotenoides y energía (Shah *et al.*, 2018), si bien es importante tener en cuenta que su valor nutricional viene determinado, además, por otros factores como su digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes intracelulares (Brown *et al.*, 1997).

En este sentido, el presente estudio proporciona una descripción inicial de la capacidad digestiva de dos especies de peces, una de naturaleza herbívora, como la lisa (*C. labrosus*), y otra de naturaleza carnívora, como la lubina (*D. labrax*) para hidrolizar las proteínas de la microalga *C. fusca* mediante técnicas de digestibilidad *in vitro* utilizando extractos enzimáticos específicos de la especie obtenidos de diferentes partes del sistema digestivo. La simulación *in vitro* ha sido previamente utilizada con éxito en distintas especies de peces como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la dorada (*S. aurata*) o el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Tibbets *et al.*, 2017; Vizcaíno *et al.*, 2018), y proporciona información acerca de la susceptibilidad de la proteína para ser hidrolizada por las proteasas digestivas de los peces.

En general, los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que las proteínas de la microalga *C. fusca* son hidrolizadas por las proteasas digestivas de ejemplares juveniles de lisa (*C. labrosus*) y de lubina (*D. labrax*). El análisis de los proteinogramas reveló una degradación progresiva de todas las bandas proteicas, de hecho, el grado de hidrólisis y de liberación de aminoácidos obtenidos tras la hidrólisis con proteasas digestivas sugieren una elevada biodisponibilidad de la proteína contenida en la biomasa *C. fusca*. En ambos casos se alcanzaron valores de CDP y de aminoácidos liberados similares a los observados con otras especies de microalgas de interés en acuicultura (Vizcaíno *et al.*, 2019) así como en otras materias primas comúnmente utilizadas en la formulación alimentos acuícolas, tales como la harina de soja, la

harina de guisante o harina de pescado (Sultana *et al.*, 2010; Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2011), si bien se obtuvieron los valores más elevados cuando se utilizan los extractos enzimáticos de lisa (*C. labrosus*). De acuerdo con estudios previos, las diferencias en el grado de hidrólisis vienen determinadas por una serie de factores, entre los que se encuentra la complejidad estructural y el perfil de aminoácidos (Tibetts *et al.*, 2017) y la presencia de paredes celulares ricas en celulosa y otros componentes como ocurre en las especies pertenecientes al género *Chlorella* (Teuling *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2020). Además, otro factor clave a tener en cuenta es la eficiencia de los animales marinos para digerir estas paredes celulares. Muchos autores sugieren que las especies carnívoras, a diferencia de las herbívoras y omnívoras, sólo secretan una limitada cantidad de enzimas carbohidrasas y que, por tanto, digieren algunos carbohidratos con menos eficiencia que omnívoros o herbívoros (Drewe *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2017). Se ha observado que las especies de hábitos herbívoros y/o omnívoros, presentan un mayor nivel de actividad amilasa, disacaridasa y celulasa que los ejemplares carnívoros (Krogdahl *et al.*, 2005), lo que guarda relación con los resultados obtenidos en este trabajo en los que se observa que la concentración de azúcares reductores fue significativamente mayor en el caso de la hidrólisis con enzimas de *C. labrosus*. Este hecho podría estar relacionado con una mayor capacidad para degradar la pared celular de la microalga facilitando así el acceso a los nutrientes, y por consiguiente con el mayor grado de hidrólisis observado en esta especie. Sin embargo, existe poca información acerca de la capacidad de los peces herbívoros para digerir los carbohidratos estructurales de las algas distintos de la celulosa, lo cual es interesante considerando que las paredes celulares de la mayoría de las microalgas marinas contienen altos niveles de este sustrato (Safi *et al.*, 2013).

En lo que respecta a la utilización de la biomasa de microalgas como ingrediente de naturaleza proteica para la elaboración de piensos acuícolas, son numerosos los estudios que han evaluado con éxito los efectos de su inclusión sobre el crecimiento y distintos aspectos de la fisiología en diversas especies de interés en acuicultura (Vizcaíno *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020) incluyendo diferentes especies de mugílidos como *Liza ramada* (El-Dahar *et al.*, 2014) o *Mugil cephalus* (Akbari y Aminikhoei, 2019; Akbari y Raeisi, 2020). Sin embargo, no se tiene conocimiento de la existencia de trabajos previos que evalúen la inclusión de microalgas en piensos para ejemplares juveniles de lisa (*C. labrosus*).

En general, se ha observado que la inclusión de microalgas no ejerce efectos negativos sobre el crecimiento de los peces, si bien la respuesta parece estar influenciada por diversos factores, como la especie de pez y de alga, el nivel de inclusión y la composición nutricional de la microalga en cuestión (Shah *et al.*, 2018). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo revelan un incremento significativo del peso final en los ejemplares alimentados con los piensos suplementados con un 15% de *C. fusca* al final del ensayo de alimentación (Tabla 2).

De acuerdo con Furne *et al.* (2008), el adecuado crecimiento del pez está estrechamente relacionado con la capacidad fisiológica para digerir y transformar los nutrientes ingeridos que, a su vez, depende en gran medida de la presencia de un adecuado conjunto de enzimas digestivas. Por lo tanto, el conocimiento sobre las actividades de las enzimas digestivas es una

herramienta clave a la hora de evaluar nuevos ingredientes para alimentos acuícolas (Deguara *et al.*, 2003). El intestino juega un papel importante en la digestión y absorción de los nutrientes, especialmente en los peces sin estómago definido como la lisa, existiendo una correlación entre la función digestiva y el desarrollo intestinal (Bakke *et al.*, 2010). Estudios previos han demostrado que la inclusión de harina de distintas especies de microalgas induce cambios significativos en algunas de las enzimas involucradas en los procesos de digestión y absorción a nivel intestinal (Vizcaíno *et al.*, 2014, 2018; Gong *et al.*, 2019; Galafat *et al.*, 2020). En concordancia con estos trabajos, los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron una marcada influencia de la inclusión de *C. fusca* en la dieta sobre los niveles de actividad enzimática evaluados, marcados por un incremento significativo de los niveles de actividad proteasa alcalina en los peces alimentados con un 15% de la microalga *C. fusca*. Resultados similares fueron encontrados por Akbary y Raeisi, (2020) quienes registraron un incremento en los niveles de actividad proteasa en ejemplares de mújol (*M. cephalus*) alimentados con piensos suplementados con hasta un 15% de *Chlorella vulgaris*, lo que podría estar relacionado con una mejora de la funcionalidad digestivas que podría conducir a una mejor absorción y utilización de nutrientes (Engrola *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios previos centrados en evaluar los cambios en el perfil de enzimas digestivas en especies de peces que modifican sus hábitos alimentarios con la edad como ocurre con *C. labrosus*, pusieron de manifiesto que estas especies experimentan cambios importantes en los niveles de actividad de algunas enzimas digestivas derivados del cambio de una dieta parcialmente carnívora durante las primeras etapas de la vida, a una predominantemente herbívora, caracterizados principalmente por un incremento en los niveles de actividad proteasa como posible mecanismo de compensación, tal y como se ha descrito en otras especies de peces herbívoros como la carpa o la tilapia (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011; Hernández-Sámano *et al.*, 2017).

En lo que respecta a las enzimas procedentes de secreción intestinal, se observó un incremento significativo en los niveles de actividad leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en los peces alimentados con las dietas suplementadas con *C. fusca*. Ambas enzimas son clave en las etapas finales de digestión de la proteína, hidrolizando los oligopéptidos liberados por las enzimas pancreáticas en aminoácidos libres, di o tripéptidos (Gisberts *et al.*, 2018) y permitiendo la absorción o el transporte de aminoácidos a través de los enterocitos (Cahu e Infante, 2001). Estas enzimas, especialmente la fosfatasa alcalina, pueden utilizarse como un indicador de la integridad intestinal y de la absorción de nutrientes, por lo que un incremento en los niveles de actividad parece estar relacionado con una mejora en la eficiencia del proceso digestivo y la capacidad de absorción intestinal (Vizcaíno *et al.*, 2014).

Además de las actividades de las enzimas digestivas, la estructura y morfología de la mucosa intestinal juega un papel clave en la absorción de nutrientes, así como en proporcionar una barrera física contra los microorganismos patógenos. En los ejemplares de naturaleza herbívora, la longitud del intestino es generalmente mayor que en los de alimentación carnívora, lo que se cree que permite el procesamiento adicional de elementos relativamente difíciles de digerir (Wilson y Castro, 2010). El estado estructural del intestino es considerado como un biomarcador

nutricional y fisiológico fiable, ya que refleja de cualquier trastorno fisiológico originado por una dieta desequilibrada o unas condiciones de alimentación inadecuadas (Gisbert *et al.*, 2008). En este trabajo, no se apreciaron efectos negativos sobre la integridad de la mucosa y del ribete en cepillo que pudieran atribuirse a la inclusión de *C. fusca* en la dieta. Al igual que lo observado en otras especies de interés en acuicultura como la dorada, el lenguado senegalés o la tilapia, la inclusión de microalgas en la dieta indujo un incremento en la altura de las vellosidades intestinales, lo que se relaciona con una mayor capacidad de absorción (Vizcaíno *et al.*, 2014; 2018; Hussein *et al.*, 2013). Adicionalmente, el análisis histológico reveló la ausencia procesos inflamatorios en la lámina propia o un acúmulo de vacuolas lipídicas en el interior de los enterocitos que pudiesen evidenciar la existencia de enteritis y/o esteatosis intestinal incipiente. De hecho, el espesor de las capas serosa, muscular y submucosa, así como el de la lámina propia, en los peces alimentados con la dieta suplementada con microalga fue menor que el observado en el grupo control.

Finalmente, el análisis ultraestructural de la mucosa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó la ausencia de daño o inflamación en la ultraestructura de la mucosa intestinal que pudieran obstaculizar sus funciones. Se observó que todos los ejemplares presentaron una morfología y disposición de los pliegues intestinales diferente al observado en otras especies de interés en acuicultura como la dorada (*S. aurata*), la lubina (*D. labrax*) o el lenguado senegalés (*S. senegalensis*), caracterizada por la presencia de numerosas crestas laminares con el ápice aplanado y distribución aleatoria similar a la observada en otras especies de mugílidos como la lisa dorada (*Liza aurata*) (Ferrando *et al.*, 2006) (Figura 12).

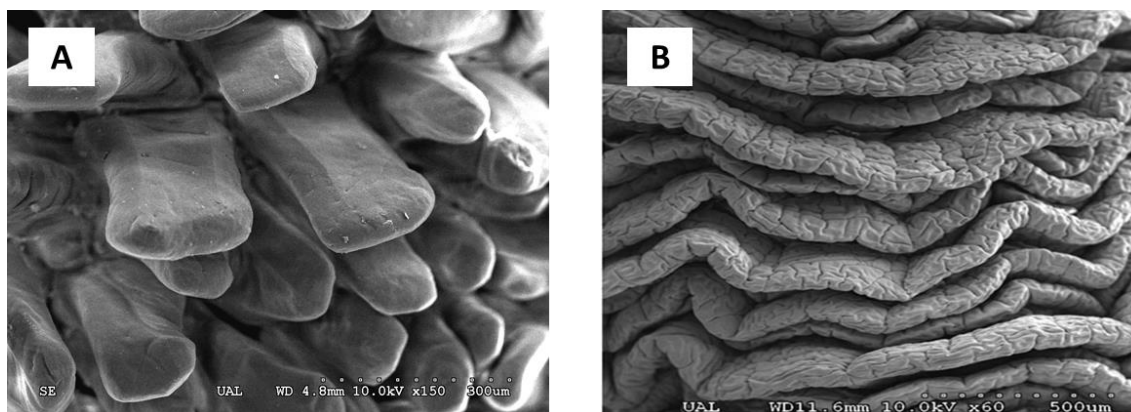


Figura 12. Detalle de la estructura tisular del intestino de la lisa *C. labrosus* (A) y la dorada *S. aurata* (B).

Al igual que se ha observado en trabajos anteriores, la inclusión de *C. fusca* en el pienso indujo un incremento de la superficie apical de los enterocitos, por lo que parece una regla general, que la inclusión de microalgas en piensos para acuicultura induce un aumento general de la

capacidad de absorción en los intestinos, así como un refuerzo de la función de la mucosa intestinal como barrera física (Galafat *et al.*, 2020; Vizcaíno *et al.*, 2014; 2016; 2018).

En general, los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto la capacidad de la lisa (*C. labrosus*) para hidrolizar la proteína de la microalga *C. fusca* pudiendo ser utilizadas como potencial ingrediente proteico en la elaboración de piensos formulados para esta especie que además serían más sostenibles desde un punto de vista medioambiental. Adicionalmente, los resultados obtenidos tras el ensayo de alimentación confirman que la utilización de *C. fusca* hasta un 15% de inclusión produce una mejora significativa en la integridad de la mucosa intestinal, observándose efectos positivos sobre los niveles de actividad enzimática y sobre su funcionalidad.

8. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de simulación digestiva *in vitro* son una herramienta útil para conocer la capacidad de las enzimas intestinales de los peces para hidrolizar las proteínas de nuevos ingredientes con los que formular piensos de acuicultura.
2. Los resultados obtenidos tras las simulaciones digestivas confirman una mayor capacidad para degradar la proteína de *Chlorella fusca* por parte de las proteasas intestinales de lisa en comparación con las enzimas de lubina. Los índices de hidrólisis de proteína y de liberación de aminoácidos confirman que la biomasa algal de puede ser utilizada como potencial ingrediente proteico en la alimentación de la lisa.
3. La inclusión de un 15% de *Chlorella fusca* en el pienso mejora el crecimiento de los juveniles de lisa. Además, se ha comprobado un efecto positivo sobre los niveles de actividad de las principales enzimas digestivas y en la funcionalidad de la mucosa intestinal.
4. Como conclusión final, los resultados obtenidos confirman que la biomasa de *Chlorella fusca* es adecuada para su utilización en la elaboración de piensos para juveniles de lisa. Dada la escasez de información relacionada con la elaboración de piensos específicos para esta especie, se recomienda la realización de nuevos ensayos de alimentación para establecer el nivel óptimo de inclusión de esta microalga en el alimento.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adenan, N.S., Yusoff, F.M. y Shariff, M. (2013). Effect of salinity and temperatura on the growth of diatoms and green algae. *J Fish Aquat Sci*, 8: 397-404.
- Ahmad, M.T., Shariff, M., Md Yusoff, F., Goh, Y.M. y Banerjee, S. (2020). Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Rev Aquacult*, 12, 328–346.
- Akbary, P. y Raeisi, E. (2020). Optimum dietary level of *Chlorella vulgaris* powder as a feed additive for some blood parameters and digestive enzymatic activities of grey mullet, *Mugil cephalus*. *Iran J Fish Sci*, 19(3), 1130-1139.
- Akbary, P., y Aminikhoei, Z. (2019). Impact of dietary supplementation of *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) on the growth, antioxidant defense and immune status of the grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). *Iran J Aquat Anim Health*, 5(1), 57-70.
- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. y Abellán, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol Biochem*, 19: 257-267.
- Alarcón, F.J., Moyano, F.J. y Díaz, M. (2001). Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. *Aquacult Int*, 9: 255-267.
- APROMAR (2020). La Acuicultura en España. *Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente*, 95.
- Bakke, A.M., Glover, C. y Krogdahl, Å. (2010). Feeding, digestion and absorption of nutrients. In *Fish physiology* (Vol. 30, pp. 57-110). Academic Press.
- Becker, E.W. (2013). Microalgae for aquaculture: nutritional aspects. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 671-691.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture*, ed. A. Richmond, 312–351. Oxford: Blackwell.
- Bergmeyer, H.V. (1974). *Phosphatases methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. Academic Press, New York.
- Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70, 313–321.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. y Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Brown, MR. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, vol 3, pp 281–292.

- Cahu, C., e Infante, J.Z. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200(1-2), 161-180.
- Cardinaletti, G., Messina, M., Bruno, M., Tulli, F., Poli, B. M., Giorgi, G., Chini-Zittelli, G., Tredici, M., y Tibaldi, E. (2018). Effects of graded levels of a blend of *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica* dried biomass on growth and muscle tissue composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets low in fish meal and oil. *Aquaculture*, 485, 173–182.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25: 294–306.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G. (1983) Spectrophotometric assay using o- phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *J Dairy Sci*, 66: 1219-1227.
- Crosetti, D. (2016). Current state of grey mullet fisheries and culture. En: Donatella Crosetti y Stephen J. M. Blaber (Eds.), *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*, CRC Press, pp. 437-440.
- De Carvalho, C.V., Bianchini, A., Tesser, M.B., y Sampaio, L.A. (2010). The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquacult Res*, 41(4), 511-518.
- De la Higuera, M. y Cardenete, G. (1993). La proteína en la nutrición de los peces. En: *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción* (Ed.) Castello Orvay F. Universidad de Barcelona, Barcelona, España, pp. 195-226
- Deguara, S., Jauncey, K. y Agius, C. (2003). Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *J Fish Biol*, 62, 1033–1043.
- Drewe, K.E., Horn, M.H., Dickson, K.A. y Gawlicka, A. (2004). Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rain forest streams. *J Fish Biol*, 64(4), 890-902.
- El-Dahhar, A.A., Salama, M.E., Moustafa, Y.T. y Elmorshedy, E.M. (2014). Effect of using algae (*Nannochloropsis Oculata*) in grey mullet (*Liza Ramada*) larval diets on growth performance and feed utilization. *J Arabian Aquacult Soc*, 9, 131-144.
- Emad, A.M., Salarzadeh, A. y Fourooghifard, H. (2015). Comparison of salinity effects and medium of TMRL, Guillard and Comway cultivation on density and bloom of *Chlorella vulgaris* alga *in vitro*. *Int J Adv Res* 3: 1236-1243.
- Engrola, S., Conceição, L.E., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., y Dinis, M.T. (2007). Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquacult Res*, 38(7), 696-707.
- FAO (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción. <http://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>.

- Ferrando, S., Maisano, M., Parrino, V., Ferrando, T., Giroso, L. y Tagliafierro, G., (2006). Gut morphology and metallothionein immunoreactivity in *Liza aurata* from different heavy metal polluted environments. *ItJ Zool*, 73, 7–14.
- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, J. y Sanz, A. (2008). Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *CBPA: Molecular & Integrative Physiology*, 149(4), 420–425.
- Galafat A., Vizcaíno A.J., Sáez M.I., Martínez T. F., Jerez-Cepa I., Mancera J.M. y Alarcón F.J. (2020). Evaluation of *Arthrospira* sp. enzyme hydrolysate as dietary additive in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *J Appl Phycol*, 32: 3089–3100
- Gisbert, E., Nolasco, H. y Solovyev, M., (2018). Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture* 487, 102–108.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B. y Sarasquete, C. (2008). Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histol Histopathol*, 23, 1525–1539.
- Gong, Y., Bandara, T., Huntley, M., Johnson, Z.I., Dias, J., Dahle, D., Sørensen, M. y Kiron, V. (2019). Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 501, 455–464.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravi Kumar, R., Ganesan, V. y Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 1737–1746.
- Hernández-Sámamo, A., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R. y Guerrero-Legarreta, I. (2017). Actividad enzimática de proteasas de *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) extraídas de una laguna contaminada en México. *Revista de Biología Tropical* 65.
- Hussein, E.E.S., Dabrowski, K., El-Saidy, D.M. y Lee, B.J. (2013). Enhancing the growth of Nile tilapia larvae/juveniles by replacing plant (gluten) protein with algae protein. *Aquacult Res*, 44(6), 937-949.
- Kirst, G.O. (1989). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu Rev Plant Phys*, 40: 21-53.
- Kotrbaček, V., Doubek, J. y Doucha, J. (2015). The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *J Appl Phycol*, 27, 2173–2180.
- Krogdahl, Å., Hemre, G., y Mommsen, T. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult Nut*, 11, 103-122.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Liu, C., Liu, H., Han, D., Xie, S., Jin, J., Yang, Y. y Zhu, X. (2020). Effects of dietary *Arthrospira platensis* supplementation on the growth performance, antioxidation and immune

- related-gene expression in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquacult Rep*, 17: 100297.
- Lovell, R.T. (2000) Nutrition of Ornamental Fish. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. Philadelphia, PA, WB Saunders, pp 1191-1196.
- Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. y Martínez, F.J. (2009). Alimentación en piscicultura. En: La nutrición y alimentación en piscicultura (Ed.) Sáenz F. Madrid, pp. 697-753.
- Martoja, R. y Martoja-Pierson, M. (1970) *Técnicas de Histología Animal*. Toray-Masson, Barcelona.
- McGoogan, B.B. y Gatlin, D.M. (1999). Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. Effects of dietary protein and energy levels. *Aquaculture*, 178(3-4), 333-348.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31(3): 426-428.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K. y Nichols, P.D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc Nat Acad Sci*, 106(36).
- Percival, E.E., y J.R. Turvey (1974). Polysaccharides of algae. In *CRC, handbook of microbiology, condensed edition, 532nd ed, ed. A.L. Laskin, and H.A. Lechevalier*. Cleveland: CRC Press Inc.
- Pereira, T.G. y Oliva-Teles, A. (2003). Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquacult Res*, 34, 1111-1117.
- Pfeiderer, G. (1970). Particle-bound aminopeptidase from pig kidney. *Methods Enzymol*, 19: 514-521.
- Pohl, P., Passig, T. y Wagner, H, (1971). Über Den Einfluss Von Anorganischem Stickstoff-Gehalt in Der Nährlösung Auf Die Fettsäure-Biosynthese in Grünalgen. *Phytochemistry* 10:1505-1513.
- Pujante, M.I. (2019). *Fisiología y bioquímica digestiva de la liseta (Chelon labrosus)* [Tesis de doctorado, Universidad de Cádiz]. <https://rodin.uca.es/xmlui/handle/10498/21268>.
- Rahimnejad, S., Lee, S.M., Park, H.G. y Choi, J. (2017). Effects of dietary inclusion of *Chlorella vulgaris* on growth, blood biochemical parameters, and antioxidant enzyme activity in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J World Aquacul Soc*, 48(1): 103-112.
- Roy, S.S. y Pal, R. (2015). Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proc Zool Soc*, 68, 1-8.
- Sáenz de Rodrigáñez, M.A., Medina, E., Moyano, F.J. y Alarcón, F.J. (2011). Evaluation of protein hydrolysis in raw sources by digestive proteases of Senegalese sole (*Solea senegalensis*,

- Kaup 1858) using a combination of an *in vitro* assay and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of products. *Aquacult Res* 42: 1639-165.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C. y Pontalier, P.Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J Appl Phycol*, 25, 523–529.
- Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M.A., Parsaeimehr, A., Liang, Y. y Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *J Appl Phycol*, 30, 197–213.
- Shi, X., Luo, Z., Chen, F., Wei, C.C., Wu, K., Zhu, X.M. y Liu, X. (2017). Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes' expression for crucian carp *Carassius auratus*. *Aquacult Res*, 48:3244–3256.
- Soliman, N.F. y Yacout, D.M.M. (2016). Aquaculture in Egypt: status, constraints and potentials. *Aquacult Int*, 24, 1201–1227.
- Sultana, Z., Ahmed, MdS., Iqbal, MdS. y Hasan Chisty, MdA. (2010). Determination of *in vitro* protein digestibility of different feed ingredients for nilotica (*Oreochromis nilotica*). *Bangladesh Res Pub J* 4 (1): 87-94.
- Teuling, E., Schrama, J.W., Gruppen, H. y Wierenga, P.A. (2017). Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). *Aquaculture*, 479, 490–500.
- Teuling, E., Wierenga, P.A., Agboola, J.O., Gruppen, H. y Schrama, J.W. (2019). Cell wall disruption increases bioavailability of *Nannochloropsis gaditana* nutrients for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 499, 269–282.
- Tibbetts, S.M., Mann, J. y Dumas, A. (2017). Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured *Chlorella vulgaris* meals at five dietary inclusion levels. *Aquaculture*, 481:25-39.
- Tibbetts, S.M., Yasumaru, F. y Lemos, D. (2017). *In vitro* prediction of digestible protein content of marine microalgae (*Nannochloropsis granulata*) meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Algal Res*, 21: 76-80.
- Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Álvarez-González, C.A., Moyano, F.J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G.E., Márquez-Couturier, G., Contreras-Sánchez, W.M., Arias-Rodríguez, L. y Indy, J.R. (2011). Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiol Biochem*, 37, 667–680.

- Valente, L.M.P., Custódio, M., Batista, S., Fernandes, H. y Kiron, V. (2019). Defatted microalgae (*Nannochloropsis* sp.) from biorefinery as a potential feed protein source to replace fishmeal in European sea bass diets. *Fish Physiol Biochem*, 45(3): 1067–1081.
- Vallainc, D., Brundu, G., Sanna, G., Antognarelli, F., Fois, N., Guerzoni, S., y Baroli, M. (2017). Reproduction and rearing of the flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) for restocking purposes. In *Aquaculture Europe 2017 Dubrovnik, Croatia*.
- Vizcaíno, A.J., López, G., Sáez, M.I., Jiménez, J.A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C. y Alarcón, F.J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture*, 431, 34–43.
- Vizcaíno, A.J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M.I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C. y Alarcón, F.J. (2018). Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish Physiol Biochem*, 44(2): 661–677.
- Vizcaíno, A.J., Saéz, M.I., López, G., Arizcun, M., Abellán, E., Martínez, T.F. y Alarcón, F.J. (2016). *Tetraselmis suecica* and *Tisochrysis lutea* meal as dietary ingredients for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fry. *J Appl Phycol*, 28(5): 2843–2855.
- Vizcaíno, A.J., Sáez, M.I., Martínez, T.F., Ación, F.G. y Alarcón, F.J. (2019). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Res*, 37, 145–153.
- Wassef, E.A., El Masry, M.H. y Mikhail, F.R. (2001). Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquacult Res*, 32, 315-322.
- Wehrheim, B. y Wetter, M. (1994). Comparative studies of the heavy metal uptake of whole cells and different types of cell walls from *Chlorella fusca*. *Biotechnol Tech*, 8:227–232.
- Wilson, J.M. y Castro, L.F.C. (2010). Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In *Fish Physiology* (Vol. 30, Issue C).
- Yadav, G., Meena, D.K., Sahoo, A.K., Das, B.K. y Sen, R. (2020). Effective valorization of microalgal biomass for the production of nutritional fish-feed supplements. *J Clean Prod*, 243, 118697.
- Yarnold, J., Karan, H., Oey, M. y Hankamer, B. (2019). Microalgal aquafeeds as part of a circular bioeconomy. *Trends Plant Sci*, 24(10), 959-970.