

Trabajo Fin de Máster
Facultad de Ciencias Experimentales
Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Evaluación de microalgas para su uso en la elaboración de piensos para acuicultura

Autor: Raúl Barreto Pérez



Directores:

Francisco Javier Alarcón López
Antonio Jesús Vizcaíno Torres
María Isabel Sáez Casado

Convocatoria: Junio 2018

Agradecimientos:

Con estas líneas quiero agradecer a la gente que, de una forma u otra, ha estado implicada en la elaboración de este trabajo, y es que, aunque no mencione a todos y cada uno, me han hecho sentir una persona afortunada, tanto por el trato recibido como por la confianza mostrada.

En primer lugar, agradecer a Dr. Antonio Jesús Vizcaíno Torres por su gran implicación en la elaboración del proyecto, y en la libertad y confianza que me ha brindado para trabajar en el laboratorio. Ha sido el principal artífice de que se hayan cumplido los objetivos y expectativas planteadas. No menos ha sido Dr. Francisco Javier Alarcón López que, desde el primer momento, me ha recibido y aceptado como su tutorando, muchas gracias. También quisiera agradecer a Dra. M.^a Isabel Sáez Casado por estar siempre pendiente de nosotros, que nunca nos faltase nada y asegurarse de que trabajásemos de forma segura y cómoda.

Una mención especial también para Alba, Chema, Germán, Laura, Luis, M.^a José y a todos los que han pasado por el laboratorio y nos han acompañado en numerosas horas de trabajo y de descanso en la hora del café. De verdad, muchas gracias y les deseo a todos la mayor de las suertes para el futuro.

Aunque ya lo saben de sobra, agradecer a mi familia que, a pesar de la distancia a la que hemos estado este año, me han hecho sentir cerca de ellos y arropado en todo momento. Nadie sabe mejor que yo del esfuerzo que se ha hecho este año en mi hogar para que yo pueda cumplir este objetivo de realizar el Máster, es algo que recordaré por siempre.

Y como no, agradecer muchísimo a la persona que me acompaña día a día, y que me hace sentir una persona afortunada, Helena, mi pareja, que me ha apoyado en todo momento, en los buenos y, sobre todo, en los peores de ellos.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto SABANA (grant # 727874) del Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea y Lifebioencapsulation SL (Almería, España).

Por último, no me quiero olvidar del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), que me ha dado la oportunidad de disfrutar de la ayuda “Convocatoria de Ayudas para la realización de TFM en Empresas (Curso Académico 2017/18)” y ha permitido que la estancia fuera de mi casa haya sido menos complicada económicamente.



ÍNDICE:

1.	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN.....	6
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1.	Microalgas.....	9
3.2.	Caracterización química de la biomasa algal	9
3.2.1.	Determinación del contenido en proteína cruda, perfil de aminoácidos y contenido en lípidos totales.....	9
3.2.2.	Determinación del perfil de ácidos grasos.....	10
3.3.	Evaluación de potenciales factores antinutritivos en la biomasa de microalgas	10
3.3.1.	Preparación de los extractos enzimáticos y determinación de actividad proteasa alcalina total	10
3.3.2.	Evaluación de factores antinutritivos.....	11
3.4.	Evaluación in vitro de la hidrólisis de la proteína por las proteasas digestivas de dorada	12
3.4.1	Hidrólisis in vitro	12
3.4.2.	Seguimiento de las hidrólisis in vitro mediante electroforesis SDS-PAGE.....	12
3.4.4.	Cuantificación de los aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis	13
3.4.5.	Cuantificación de azúcares reductores liberados	14
3.5.	Análisis estadístico.....	14
4.	RESULTADOS	15
4.1.	Caracterización química de la biomasa algal.....	15
4.2.	Evaluación de la presencia de inhibidores de proteasa en la biomasa de microalgas.....	18
4.3.	Evaluación in vitro de la hidrólisis de la proteína de las diferentes microalgas evaluadas por las proteasas de dorada	19
5.	DISCUSIÓN.....	23
6.	CONCLUSIONES.....	27
7.	BIBLIOGRAFÍA	28

1. RESUMEN

El rápido crecimiento de la acuicultura y la actual necesidad de buscar fuentes alternativas de proteína requiere esfuerzos centrados en la búsqueda de nuevos ingredientes para su utilización en nutrición acuícola. En este sentido, el presente trabajo se centra en la caracterización química de la biomasa liofilizada de cinco especies de microalgas (*Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella vulgaris*, *Spirogyra* sp., *Anabaena* sp. y *Tisochrysis lutea*) y su potencial para ser utilizadas como ingrediente en la elaboración de piensos acuícolas. Así, se determinó la composición química de las diferentes harinas algales mediante métodos estandarizados y se evaluó la presencia de inhibidores de la proteasa en la biomasa de microalgas con capacidad para inhibir las proteasas digestivas de la dorada (*Sparus aurata*). Adicionalmente, se evaluó la hidrólisis *in vitro* de la proteína de las microalgas por las proteasas digestivas de dorada.

El contenido en proteína cruda varió desde 25,25% (*Spirogyra* sp.) hasta 60,88% (*Anabaena* sp.), y el contenido en lípidos totales lo hizo desde 6,53% (*C. vulgaris*) hasta 21,28% (*N. gaditana*). El perfil de ácidos grasos resultó muy variable entre las especies estudiadas, con el predominio de los ácidos grasos saturados (SFA) en todas las especies analizadas (desde 15-36%) y con presencia exclusiva de EPA (20:5n3) en *Spirogyra* sp. y *T. lutea* y DHA únicamente en *T. lutea*. El perfil de aminoácidos resultó ser muy similar en todas las microalgas, con un buen contenido en aminoácidos esenciales. Por su parte, los resultados del ensayo de inhibición revelaron la presencia de cierta capacidad de inhibición de la actividad proteolítica en *C. vulgaris* requiriendo para ello niveles de inclusión en piensos muy elevados. Finalmente, los datos obtenidos tras las simulaciones *in vitro* mostraron una hidrólisis eficiente de la proteína de estas microalgas por las proteasas de dorada. En general, los resultados obtenidos revelaron que las microalgas evaluadas podrían usarse como ingrediente para alimentos acuícolas. El alto contenido de proteína unido al adecuado perfil de aminoácidos y a su adecuado grado de hidrólisis hace que las microalgas sean un ingrediente interesante con posibilidades de mejorar el valor nutricional de los alimentos acuícolas.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la pesca extractiva cubre con muchas dificultades la creciente demanda de pescado para el consumo humano a nivel mundial. Ante este hecho, la acuicultura se considera como la mejor posibilidad de mantener las proporciones adecuadas de pescado en la dieta. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, en el año 2014 se alcanzó un récord cuando el porcentaje de pescado proveniente de piscifactorías superó al porcentaje de pescado capturado del medio natural (FAO, 2016).

Dentro de la industria acuícola, la alimentación de los peces de cultivo constituye uno de los factores clave en el éxito o fracaso de una explotación, siendo el alimento el factor económico de mayor incidencia en los costes de producción (Madrid *et al.*, 2009). De hecho, los alimentos acuícolas representan alrededor del 30-60% de sus costos de producción por lo que, una óptima utilización de los nutrientes en cada una de las especies cultivadas es de vital importancia para alcanzar un desarrollo sostenible de la acuicultura. A pesar de que en los últimos años se ha reducido las tasas de inclusión de harina y aceite de pescado en alimentos acuícolas, aún existe una demanda creciente de este ingrediente debido al aumento en la producción acuícola mundial (Naylor *et al.*, 2009). Este aumento de la demanda, junto con la disminución de los recursos pesqueros destinados a su producción, ha llevado a que los precios de este ingrediente casi se tripliquen durante la última década. Por lo tanto, encontrar y evaluar nuevas fuentes de proteína sigue siendo un desafío para la industria acuícola actual.

Se ha comprobado que la utilización de fuentes de proteína de origen vegetal induce un adecuado crecimiento en los peces, sin embargo, algunas de las fuentes de estas fuentes alternativas de proteína presentan algunas desventajas como son una baja digestibilidad, deficiencias en ciertos aminoácidos esenciales como lisina, metionina, treonina y triptófano, pudiendo dar lugar a cambios significativos en la calidad nutricional del producto final (Li *et al.*, 2009).

En este sentido, las microalgas tienen potencial para reducir la dependencia de las materias primas convencionales utilizadas en la elaboración de piensos para acuicultura, ya sea para su utilización como fuente alternativa de proteína o como aporte complementario de lípidos, vitaminas y minerales (Tibaldi *et al.*, 2015; Vizcaíno *et al.*, 2016). Además, presentan otras ventajas desde el punto de vista tecnológico. Las microalgas pueden crecer en una amplia gama de hábitats, algunas especies tienen una producción de biomasa varias veces mayor que las plantas, pueden dividirse rápidamente sin unas necesidades nutricionales complejas y su disponibilidad no depende de los recursos naturales (Hemaiswarya *et al.*, 2011). Sin embargo, su utilización como sustitutivo de la harina de pescado y el aceite de pescado en la industria de la acuicultura presenta algunos inconvenientes y desafíos, siendo el más destacable los altos costos de producción (Becker 2007; Sarker *et al.*, 2016)

Durante los últimos años, los estudios relacionados con el uso de microalgas como potencial ingrediente en la elaboración de alimentos acuícolas han aumentado exponencialmente (Shah *et al.*, 2018). Son numerosos los trabajos que han evaluado el efecto de la inclusión de diferentes especies de microalgas en piensos para peces cultivados, destacando efectos positivos sobre el crecimiento y la utilización del alimento (Velázquez *et al.*, 2018; de Cruz *et al.*, 2018), sobre el metabolismo lipídico (Robin y Vincent, 2003) o sobre la funcionalidad digestiva del animal (Vizcaíno *et al.*, 2014, 2016; 2018).

Según de la Higuera y Cardenete (1987), entre los criterios que hay que considerar para la selección de una materia prima como fuente de proteína alternativa se deben de tener en cuenta: i) el contenido en proteína, ii) la aceptabilidad por el animal, iii) la digestibilidad, iv) la ausencia de factores antinutritivos y v) el perfil de aminoácidos.

Desde el punto de vista nutricional, las microalgas se caracterizan principalmente por su elevado contenido en proteína de buena calidad, con perfiles de aminoácidos comparables a los de otros ingredientes utilizados comúnmente en nutrición acuícola (Becker, 2007). En general, la mayoría de las microalgas presentan un contenido en proteína alrededor del 30-55 % en peso seco (López *et al.*, 2010), sin embargo, existen

algunas especies pertenecientes a los géneros *Spirulina*, *Scenedesmus* y *Chorella* en las que el contenido en este macronutriente alcanza hasta el 50-70 % en peso seco (Venkataraman y Becker, 1985). Por otro lado, el contenido de lípidos oscila entre el 2-50% en peso seco, llegando al 80% en algunas casos (Chisti, 2007). Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen los lípidos procedentes de microalgas para su uso en alimentación de peces de cultivo (Atalah *et al.*, 2007; Cardinaletti *et al.*, 2018; Ganuza *et al.*, 2008). A diferencia de las fuentes vegetales de origen terrestre, las microalgas pueden producir directamente ácidos grasos poliinsaturados como el araquidónico (ARA, 20:4n-6), el eicosapentanoico (EPA; 20:5n3) y el docosahexaenoico (DHA; 22:6n3), siendo un factor clave en la evaluación de su calidad nutricional (Reitan *et al.*, 1997). En cuanto al contenido en hidratos de carbono, las microalgas presentan entre un 5% y un 20% en peso seco (Brown *et al.*, 1997). La composición de polisacáridos varía notablemente entre especies (Brown, 2002). La mayoría de estos azúcares son componentes de la pared celular y desempeñan un rol importante en la digestibilidad de la biomasa microalgal (Percival y Turvey, 1974).

La existencia de paredes celulares recalcitrantes ricas en celulosa y otros componentes, actúan a modo de barrera protectora limitando su digestibilidad (Safi *et al.*, 2013). 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).

Dadas estas consideraciones, el principal objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial de la biomasa liofilizada de cinco cepas de microalgas (*Tisochrysis lutea*, *Anabaena* sp., *Chlorella vulgaris*, *Spirogyra* sp. y *Nannochloropsis gaditana*) para su uso como ingrediente/aditivo en piensos de peces marinos.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos, i)

caracterización química de la harina procedente de cada una de las cinco microalgas de interés en acuicultura, ii) evaluación de la presencia de factores antinutritivos y iii) evaluación mediante un sistema *in vitro* de la digestibilidad de la biomasa algal por enzimas digestivas de dorada (*Sparus aurata*).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microalgas

La biomasa liofilizada de 5 especies diferentes de microalgas (*Nannochloropsis gaditana* (NAN), *Tisochrysis lutea* (TLU), *Chlorella vulgaris* (CHL), *Anabaena* sp. (ANA) y *Spirogyra* sp. (SPG) fue proporcionada por el Banco Español de Algas, BEA (Las Palmas de Gran Canaria, España). Todas las cepas fueron cultivadas en medios de cultivo estándar bajo condiciones de laboratorio de acuerdo con la metodología establecida, intensidad de luz a $240 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 (L: D), temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 1,5% de aire enriquecido en CO_2 suministrado continuamente durante el período de luz. Tras el cosechado del cultivo mediante centrifugación, la biomasa microalgal se congeló a -18°C para su posterior liofilización y molturado. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo con la literatura existente acerca de su potencial interés para su uso en acuicultura.

3.2. Caracterización química de la biomasa algal

3.2.1. Determinación del contenido en proteína cruda, perfil de aminoácidos y contenido en lípidos totales

El contenido en proteína cruda de la biomasa liofilizada de las cinco cepas de microalgas se determinó mediante un análisis elemental (C:H:N) empleando un analizador elemental de la marca ELEMENTAR Vario Micro CHNS (Número de serie: 15095079) fabricado por Elementar Analysensysteme GmbH, Donaustrasse 7, 63452 Hanau (Alemania), multiplicando el contenido de nitrógeno de cada una de las muestras por 6,25

(Sánchez-Lozano *et al.*, 2007). El perfil de aminoácidos se analizó mediante HPLC (Waters 474, Waters, Milford, MA, EE. UU.) siguiendo la metodología descrita Bosch *et al.* (2006). El contenido en lípidos totales de cada microalga se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Folch (1957). Brevemente, los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Seguidamente el solvente orgánico fue evaporado en estufa a 100°C, y el contenido lipídico se determinó por gravimetría.

3.2.2. Determinación del perfil de ácidos grasos.

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez-Ruiz *et al.* (1998). El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 4890 Series II (Hewlett Packard Company, Avondale, PA) usando una modificación del método de transesterificación directa descrito por Lepage y Roe (1984) que no necesita separación previa de la fracción lipídica y que permite un ahorro de tiempo y reactivos.

3.3. Evaluación de potenciales factores antinutritivos en la biomasa de microalgas

3.3.1. Preparación de los extractos enzimáticos y determinación de actividad proteasa alcalina total

Se utilizaron ejemplares juveniles de dorada (*S. aurata*), con un peso corporal medio de 20 g suministrados por una piscifactoría local (Predomar, Almería, España). Dichos peces fueron alimentados tres veces al día con un pienso comercial, cuya composición era 45% proteína y 12% lípidos, a razón de un 2% de su peso corporal. Se obtuvieron 10 peces al azar, se anestesiaron y se sacrificaron con 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. Seguidamente se abrió el abdomen y se extrajo el intestino. Se agruparon todos los intestinos y se homogenizaron con agua destilada (500 mg mL⁻¹) empleando un

potter de vidrio esmerilado. El homogeneizado se sonicó en frío (4°C) mediante tres pulsos de 10 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm durante 12 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se repartió en alícuotas para su conservación a -20°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteína soluble en los extractos de acuerdo con la metodología descrita por Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

Finalmente, 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 1 µg 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.

3.3.2. Evaluación de factores antinutritivos

Se determinó la capacidad de inhibición de los inhibidores de proteasa presentes en la biomasa liofilizada de las diferentes microalgas sobre las proteasas intestinales de juveniles de dorada (*Sparus aurata*). Para ello, se prepararon extractos acuosos de las harinas algales (0,1 mg mL⁻¹). Para el ensayo de inhibición, un mismo volumen de extracto intestinal de dorada se preincubó durante 1 hora a 4°C con volúmenes crecientes del extracto de microalga. Se incluyó un control enzimático en el que en lugar de la solución con potencial efecto inhibidor se dispensaron 10 µL de agua destilada. Pasado ese tiempo, se determinó la actividad proteasa alcalina siguiendo la metodología descrita por Alarcón *et al.* (1998). Cada ensayo se realizó por triplicado. Los valores obtenidos fueron expresados como porcentaje de actividad residual, utilizando como referencia los valores de absorbancia del ensayo control.

3.4. Evaluación in vitro de la hidrólisis de la proteína por las proteasas digestivas de dorada

3.4.1 Hidrólisis in vitro

La hidrólisis de la proteína de las cinco microalgas ensayadas se llevó a cabo mediante un ensayo de hidrólisis *in vitro* de acuerdo con la metodología descrita por Sáenz de Rodríguez *et al.* (2011). Para la simulación se utilizaron reactores de 10mL encamisados provistos de un sistema de recirculación de agua que permite mantener la temperatura constante a 37°C, y en agitación continua. Para cada ensayo, se suspendió una cantidad conocida de microalga que proporcionase 80 mg de proteína en tampón TRIS-HCl (pH 9,0). La mezcla se mantuvo en agitación durante 15 min, y a continuación se inició la reacción adicionando un volumen conocido de extracto enzimático de dorada proporcionando 200 U. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura y agitación constante durante 90 minutos. Durante el transcurso de la hidrólisis enzimática 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 para cada una de las microalgas estudiadas en ausencia de extracto enzimático de dorada. Todos las microalgas se ensayaron por triplicado.

3.4.2. Seguimiento de las hidrólisis in vitro mediante electroforesis SDS-PAGE

Con el objetivo de evaluar el grado de hidrólisis de las principales fracciones proteicas presentes en la biomasa liofilizada de las distintas microalgas se realizaron electroforesis SDS-PAGE de acuerdo con la metodología descrita por 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.

Adicionalmente, en cada gel se incluyó un volumen determinado de marcador de peso molecular (S-84445 SigmaMarker™, St. Louis, USA). Tras la electroforesis, los geles obtenidos se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución de tinción (Azul Comassie Brilliant Blue R, Metanol, Ácido Acético glacial y agua) durante toda la noche. Se estimó la movilidad electroforética relativa (Rf) de las principales fracciones observadas en los proteinogramas, y se calculó el peso molecular mediante la relación lineal entre el Rf y el log₁₀ del peso molecular de las proteínas del marcador utilizando el software específico myImageAnalysis™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Los geles se resolvieron a 200 V durante 60 minutos, utilizando una cubeta y una fuente de alimentación de la marca comercial Bio-Rad.

El grado de hidrólisis proteica se evaluó mediante análisis densitométrico de los geles, utilizando el software informático myImageAnalysis (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Posteriormente se determinó el Coeficiente de Degradación Proteica (CDP) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CDP = \sum_{i=1}^n \left[\frac{DO_i(t=0) - DO_i(t=90min)}{DO_i(t=0)} \times 100 \right] \times \frac{DO_i(t=0)}{\sum_{i=1}^n DO_i(t=0)}$$

Donde *i* es la banda proteica principal de 1 a *n*, *DO_i* es la densidad óptica de la banda *i* y *t* es el tiempo de reacción.

3.4.4. Cuantificación de los aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis

La cantidad de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis se cuantificó a 340nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) de acuerdo con la metodología descrita por Church *et al.* (1983), usando L-leucina como patrón. Este método se basa en la reacción del ortophenilaldehído (OPA) y el β-mercaptoetanol con las aminas primarias de los aminoácidos libres. Los grupos α-amino liberados en la hidrólisis proteica reaccionan con el OPA y con el β-mercaptoetanol para dar lugar a un complejo que absorbe fuertemente a 340nm. Previamente, las muestras se

diluyeron (1:1) con TCA al 20% (p/v) para detener la reacción y se centrifugaron (12.000 rpm, 4°C, 20 min). Los resultados se expresaron como la cantidad acumulada de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis enzimática (g 100 g de proteína⁻¹).

3.4.5. Cuantificación de azúcares reductores liberados

La cuantificación de los azúcares reductores liberados durante el proceso de hidrólisis se determinó utilizando el método DNS (ácido dinitrosalicílico) descrito por Miller (1959), empleando glucosa como estándar. Previamente las muestras se hirvieron durante 5 minutos para detener la reacción enzimática.

3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en todos los ensayos realizados son representados en tablas con la correspondiente media \pm desviación estándar (sd) de, al menos, tres réplicas. Además, los datos tratados y representados como porcentajes se normalizaron previamente mediante la raíz cuadrada del arco seno de la réplica en su valor en tanto por uno para, posteriormente, realizar el análisis estadístico con el software Statgraphics Plus 4.0 para Windows (Rockville, Maryland, USA). En todos los casos se comprobó si los resultados seguían una distribución normal y la homogeneidad de la varianza. En los casos en los que los datos no seguían una distribución normal y no existía homogeneidad en las varianzas, se transformaron mediante el logaritmo neperiano o la raíz cuadrada de la variable, en función del menor valor del número de Barlett's.

El análisis estadístico se llevó a cabo con un ANOVA simple en los datos con una distribución paramétrica o con Kruskal-Wallis en aquellas variables con distribución no paramétrica. En el caso de que las variables mostraran diferencias significativas entre los valores de los distintos tratamientos, estos últimos fueron analizados mediante un test de comparación múltiple; i) test de Tukey para los datos paramétricos, o ii) mediante una gráfica de cajas y barras (Box and Whisker Plot) para los no paramétricos. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significación de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización química de la biomasa algal

El contenido en proteína cruda y lípidos totales se detalla en la Tabla 1. El contenido en proteína de la biomasa liofilizada de las microalgas varió entre un 25 y un 60%, observándose los valores más elevados en *ANA* y *CHL*, y el más bajo en *SPG*. Respecto al contenido total de lípidos, también se observaron diferencias significativas entre las distintas especies estudiadas ($p < 0,05$). *NAN* y *TLU* presentaron el mayor contenido en lípidos con un 21 y un 18% (MS) respectivamente, mientras que *CHL* presentó un contenido en lípidos inferior al 7% (MS).

Tabla 1. Contenido en proteína cruda y lípidos totales (% materia seca, MS) en las diferentes microalgas evaluadas.

	Proteína cruda (%)				Lípidos totales (%)			
<i>NAN</i>	31,38	±	0,01	b	21,28	±	1,11	d
<i>CHL</i>	43,19	±	0,27	d	6,53	±	2,41	a
<i>SPG</i>	25,25	±	0,09	a	9,31	±	0,31	b
<i>ANA</i>	60,88	±	0,18	e	14,09	±	0,17	c
<i>TLU</i>	34,10	±	0,28	c	18,48	±	0,46	d
<i>p</i>	< 0,001				< 0,001			

Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*.; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*. Valores expresados como media ± SD (n=3). Los valores en la misma columna con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

La composición de aminoácidos de cada una de las especies de microalgas ensayadas se muestra en la Tabla 2. En general, todas las microalgas mostraron un perfil de aminoácidos similar con un adecuado contenido en aminoácidos esenciales (EAA). En general, se observó un adecuado contenido en arginina, metionina y lisina. En todos los casos, la relación EAA/NEAA fue superior a uno.

La Tabla 3 muestra el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de las diferentes especies de microalgas evaluadas. En general, se observó una gran variabilidad entre las distintas cepas de microalgas. Los ácidos grasos saturados (SFA) fueron el grupo predominante en todas las especies analizadas (desde 15-36%), seguido de los monoinsaturados (MUFA; 8-26%). La fracción de ácidos grasos saturados fue

significativamente mayor en *ANA* y *SPG* ($p < 0,05$), debido principalmente al alto contenido de ácido palmítico (16:0) observado en ambas cepas. *NAN* y *ANA* presentaron el mayor contenido en MUFAs, destacando un elevado contenido en ácido oleico (18:1n9) y palmitoleico (16:1n7). En lo que respecta a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), no se detectó presencia de ácido araquidónico (ARA, 20:4n6) en ninguna de las microalgas examinadas. Solo *SPG* y *TLU* presentaron ácido EPA (20:5n3), mientras que DHA solo fue detectado en *TLU*. Otro ácido graso de especial interés en nutrición acuícola es el ácido linolénico (18:3n3), el cual se encontró en todas las microalgas analizadas, especialmente *SPG*, *ANA* y *CHL*. El contenido total de ácidos grasos n-3 fue diferente en cada una de las microalgas, alcanzándose los valores más elevados en *SPG* y *TLU* (21,3 y 45,8%, respectivamente). Por su parte *CHL* y *NAN* presentaron los mayores contenidos en n-6.

Tabla 2: Composición de aminoácidos (% total aminoácidos analizados) de las microalgas analizadas.

	<i>NAN</i>	<i>CHL</i>	<i>SPG</i>	<i>ANA</i>	<i>TLU</i>
Alanina	4,78	5,20	4,94	5,62	4,97
Asparagina + Ácido Aspártico	6,79	7,21	6,83	7,88	7,22
Glutamina + Ácido Glutámico	7,78	8,28	7,75	8,46	8,29
Glicina	3,96	4,18	4,16	4,39	4,14
Prolina	5,78	5,27	5,43	5,13	5,27
Serina	5,04	5,07	5,38	5,40	5,07
Tirosina	8,67	8,21	8,59	7,78	8,39
Arginina*	8,80	8,95	8,69	9,09	8,78
Histidina*	6,01	5,61	5,91	5,14	5,62
Isoleucina*	5,38	5,23	5,43	5,44	5,38
Leucina*	6,04	6,36	6,12	6,52	6,35
Lisina*	5,73	5,97	5,75	5,55	5,84
Metionina*	6,13	5,56	5,95	5,15	5,82
Fenilalanina*	8,13	7,93	8,16	7,39	7,90
Treonina*	5,72	5,67	5,68	5,71	5,65
Valina*	5,27	5,32	5,21	5,37	5,31
AA Esenciales	57,20	56,59	56,91	55,36	56,65
AA no Esenciales	42,80	43,41	43,09	44,64	43,35
Ratio EAA / NEAA	1,34	1,30	1,32	1,24	1,31

Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*; EAA: Aminoácidos esenciales; NEAA: Aminoácidos no esenciales. Valores expresados en porcentaje (%) sobre el total de aminoácidos analizados. * indica los aminoácidos esenciales.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (% del total ácidos grasos) de la biomasa liofilizada de las distintas microalgas.

	NAN			CHL			SPG			ANA			TLU		
14:0	0,62	± 0,04	a	0,59	± 0,09	a	0,93	± 0,06	b	0,62	± 0,05	a	13,40	± 0,11	c
16:0	21,33	± 0,09	c	14,13	± 0,08	b	33,64	± 0,79	e	29,22	± 0,21	d	11,78	± 0,06	a
16:1n7	1,13	± 0,01	a	1,40	± 0,00	b	2,50	± 0,10	c	15,81	± 0,09	e	4,12	± 0,20	d
16:2n4				0,15	± 0,01										
16:3n4	7,87	± 0,05	c	4,27	± 0,03	b				0,49	± 0,04	a	0,58	± 0,23	a
16:4n1	3,26	± 0,06													
18:0	5,26	± 0,01	e	0,74	± 0,01	b	2,12	± 0,09	d	1,50	± 0,01	c	0,27	± 0,02	a
18:1n9	16,58	± 0,09	e	6,71	± 0,06	b	5,65	± 0,24	a	7,75	± 0,02	c	8,46	± 0,07	d
18:1n7	1,68	± 0,01	c	0,82	± 0,03	a	3,15	± 0,06	d	3,12	± 0,01	d	0,93	± 0,01	b
18:2n6	24,29	± 0,17	d	29,37	± 0,13	e	12,43	± 0,43	b	13,35	± 0,03	c	5,67	± 0,07	a
18:3n3	8,76	± 0,03	a	17,66	± 0,10	d	18,31	± 0,48	e	16,04	± 0,04	c	9,59	± 0,14	b
18:4n3	2,93	± 0,01											23,00	± 0,33	
20:4n6, AA															
20:5n3, EPA							2,77	± 0,06					0,71	± 0,01	
22:5n3													1,92	± 0,05	
22:6n3, DHA													10,63	± 0,29	
Otros	6,13	± 0,42	a	23,30	± 1,74	d	17,53	± 0,76	cd	11,97	± 0,18	bc	8,67	± 0,48	ab
Total saturados	27,21	± 0,13	c	15,45	± 0,05	a	36,69	± 0,94	e	31,35	± 0,26	d	25,32	± 0,28	b
Total monoinsaturados	19,39	± 0,11	c	8,58	± 0,77	a	11,31	± 0,21	a	26,70	± 0,11	d	13,51	± 0,13	b
Total PUFAs							3,29	± 0,66					13,51	± 0,19	
n-3	11,70	± 0,02	a	17,66	± 0,10	c	21,31	± 0,22	d	16,04	± 0,04	b	45,84	± 0,79	e
n-6	24,29	± 0,17	c	29,37	± 0,13	d	12,94	± 0,30	b	13,35	± 0,03	b	5,92	± 0,22	a
n-9	16,58	± 0,09	e	6,71	± 0,06	b	5,65	± 0,24	a	7,75	± 0,02	c	8,46	± 0,07	d
n-3 PUFAs	2,93	± 0,01	a				3,00	± 0,26	a				36,25	± 0,65	b
n-3/n-6	0,48	± 0,00	a	0,60	± 0,00	b	1,65	± 0,05	d	1,20	± 0,00	c	7,76	± 0,42	e
EPA/DHA													15,00	± 0,43	

Códigos: NAN: *N. gaditana*; CHL: *C. vulgaris*.; SPG: *Spirogyra* sp.; ANA: *Anabaena* sp.; TLU: *T. lutea*. Valores expresados como media ± SD (n=3). Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

4.2. Evaluación de la presencia de inhibidores de proteasa en la biomasa de microalgas.

La Figura 1 muestra la inhibición de la actividad proteasa alcalina de los extractos digestivos de dorada cuando se añaden en el ensayo distintas proporciones del extracto acuoso de las distintas microalgas objeto del estudio. *CHL* alcanzó los valores más elevados llegando a producir un 23% de inhibición de la actividad proteasa alcalina, mientras que *TLU* y *ANA* mostraron unos niveles de inhibición inferiores al 6%. Cada curva de inhibición se ajusta a una ecuación cuadrática (Tabla 4) que puede usarse para predecir el grado de inhibición esperado, conociendo el nivel de actividad proteasa en el intestino y la cantidad de alimento ingerido. Así, desde el punto de vista fisiológico, una dorada de 20g de peso medio corporal, la actividad de proteasa total liberada después tras la ingesta es de aproximadamente 1.000 unidades de actividad (U). Si se alimentan a razón de un 2% en con un pienso suplementado con un 15% de microalga, la relación inhibidor:enzima sería de 60 μ g de inhibidor U⁻¹, que supondría un porcentaje de inhibición inferior al 3% en *NAN*, *ANA* y *TLU*, e inferior al 10% en *CHL* y *SPG*.

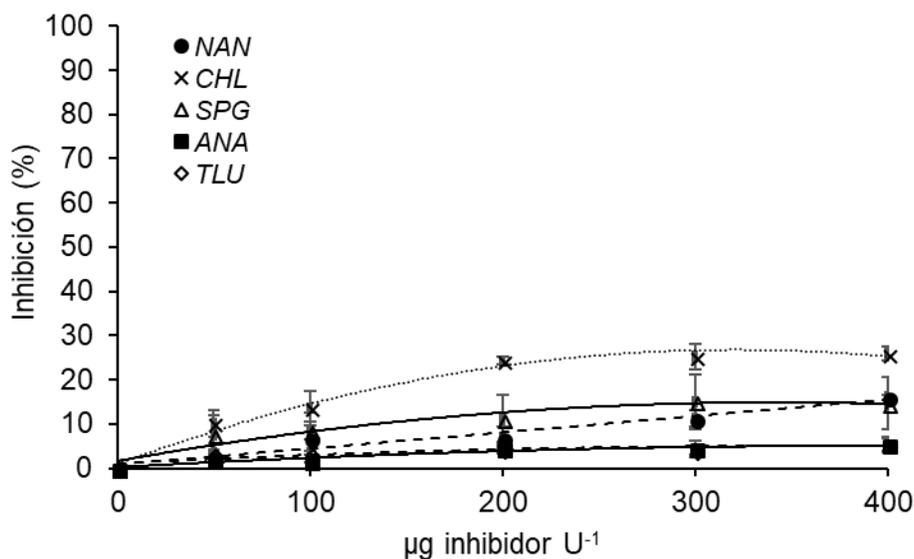


Figura 1. Curva de inhibición de la actividad proteasa alcalina en función de la concentración de inhibidor. Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*.; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas materias proteicas ensayadas para un mismo tiempo de muestreo ($p < 0,05$).

Tabla 4. Ecuaciones cuadráticas de las curvas de inhibición de las distintas microalgas.

	Ecuación polinómica	R ²
<i>NAN</i>	$y = 3E-06x^2 + 0,0357x + 0,8366$	0,9489
<i>CHL</i>	$y = -0,0003x^2 + 0,1609x + 0,956$	0,9839
<i>SPG</i>	$y = -0,0001x^2 + 0,0776x + 1,6139$	0,931
<i>ANA</i>	$y = -3E-05x^2 + 0,0243x + 0,1977$	0,941
<i>TLU</i>	$y = -3E-05x^2 + 0,0224x + 1,0677$	0,7647

Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*.; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*.

4.3. Evaluación *in vitro* de la hidrólisis de la proteína de las diferentes microalgas evaluadas por las proteasas de dorada

La Figura 2 muestra la evolución de la hidrólisis proteica de la biomasa liofilizada de las microalgas analizadas por las proteasas digestivas de dorada. En general, todas las microalgas mostraron un patrón de bandas complejo caracterizado por la presencia de varias fracciones proteicas de diferente peso molecular. No se observó degradación de las proteínas en ninguna de las microalgas cuando la simulación *in vitro* se llevó a cabo en ausencia de extracto enzimático de dorada. En todos los casos se observó una degradación progresiva de la mayoría de las fracciones proteicas durante los 90 minutos de hidrólisis enzimática. En comparación con las demás microalgas evaluadas, *TLU* mostró una rápida degradación durante los primeros 30 minutos de hidrólisis enzimática llegando a ser casi hidrolizada por completo después de 90 minutos de reacción. Las demás especies mostraron una degradación más lenta, aunque sostenida, durante todo el proceso de hidrólisis enzimática. En general, todas las microalgas mostraron una fracción proteica de entre 60-65kDa y otra de entre 20-25kDa cuya degradación fue menos marcada que la observada en el resto de las bandas proteicas. Este hecho se observó especialmente en *CHL* dónde ambas fracciones permanecieron casi inalteradas durante los primeros 60 minutos de hidrólisis enzimática.

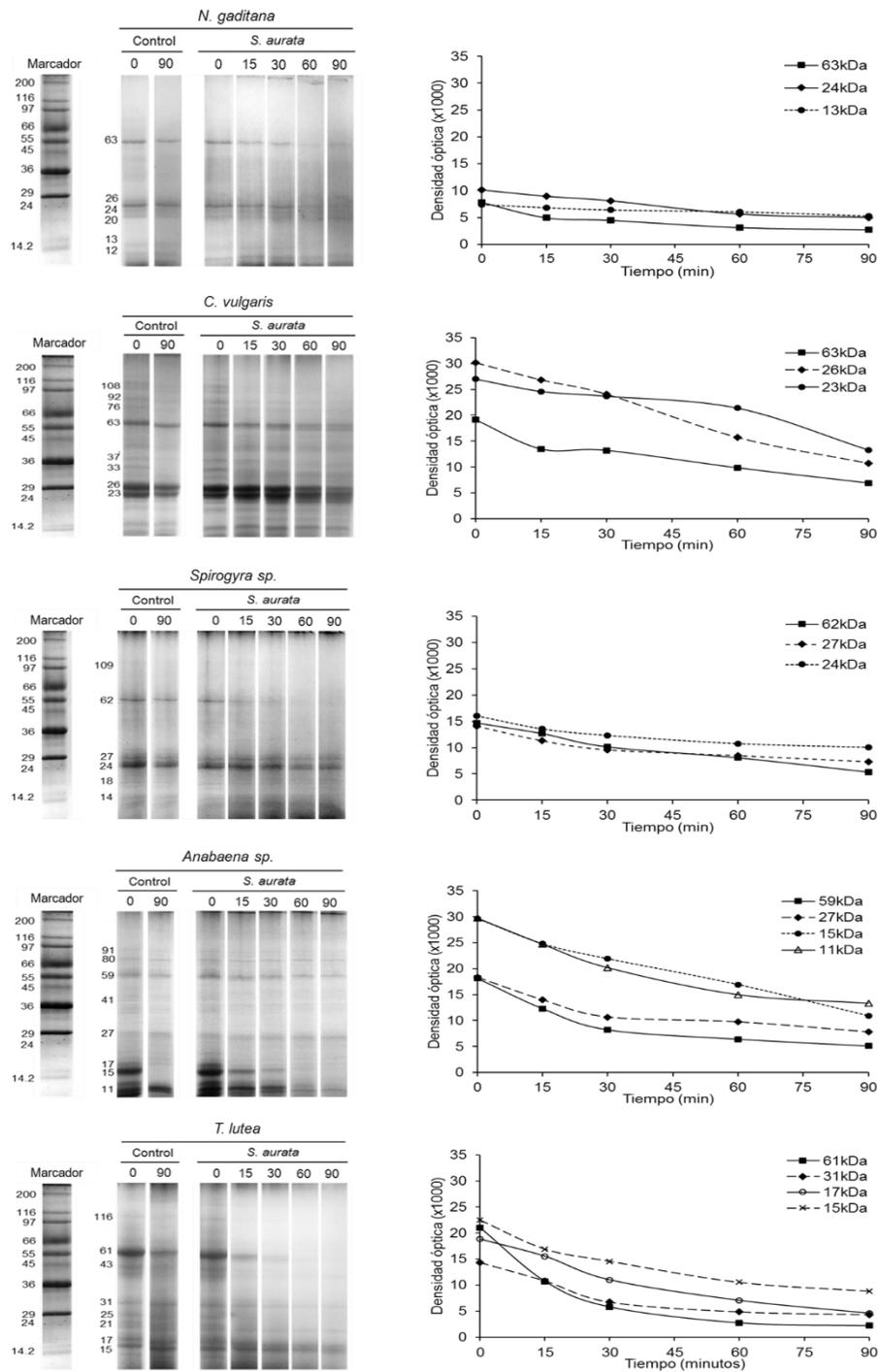


Figura 2. Evolución de la hidrólisis proteica de las diferentes microalgas por las proteasas digestivas de dorada. Las imágenes muestran los proteinogramas obtenidos en cada punto de muestreo (0, 15, 30, 60 y 90min), y las gráficas representan los cambios en la densidad óptica (medida como megapíxeles por cm²) de las principales fracciones proteicas durante el transcurso del ensayo. Los números que aparecen a la izquierda de los proteinogramas indican el peso molecular (kDa) de las principales fracciones analizadas.

La Figura 3A muestra la evolución de los valores medios de CDP durante el transcurso de la hidrólisis. *TLU* mostró una rápida degradación en los primeros 30 minutos de hidrólisis seguido de una evolución menos acentuada, aunque mantenida hasta los 90 minutos de reacción, alcanzando valores de CDP superiores al 78%. Por su parte, las demás microalgas evaluadas mostraron una evolución del CDP progresiva pero menos evidente que la observada en *TLU*, alcanzándose valores finales significativamente más bajos ($p < 0,05$), en torno a un 64% para *CHL* y *ANA*, y de un 50% para *SPG* y *NAN*.

La liberación de aminoácidos también fue progresiva en todas las microalgas evaluadas (Figura 3B). Se observaron dos patrones diferentes de liberación de aminoácidos. Por un lado, la liberación de aminoácidos en *TLU*, *ANA* y *CHL* fue progresiva durante los 90 minutos de hidrólisis enzimática, mientras que *NAN* y *SPG* mostraron una rápida liberación durante los primeros 15 minutos, seguido de una evolución menos marcada. Al final del ensayo, los mayores niveles de liberación de aminoácidos se observaron en *TLU* ($p < 0,05$) con una cantidad total de aminoácidos liberados de un 27%. La menor cantidad se obtuvo en *SPG* con un 12% de aminoácidos liberados al final de la hidrólisis enzimática.

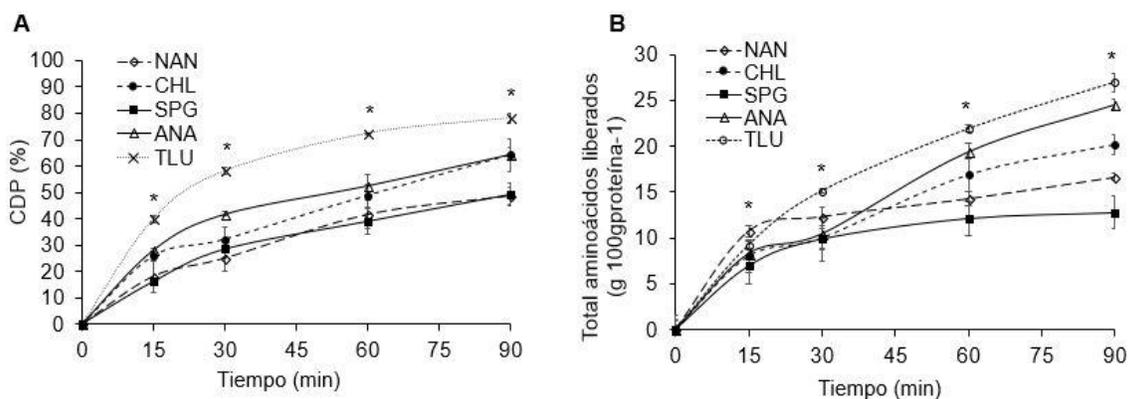


Figura 3. Evolución del coeficiente de degradación proteica (CDP) (A) y de la liberación de aminoácidos al medio (B) durante la hidrólisis de las diferentes microalgas por los extractos enzimáticos de dorada. Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*.; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas materias proteicas ensayadas para un mismo tiempo de muestreo ($p < 0,05$).

Adicionalmente se encontró una relación lineal entre los valores de CDP y la cantidad de aminoácidos liberados durante la hidrólisis enzimática (Tabla 5) como así lo indican los valores de R^2 . La correlación más alta se observó en *CHL*, con una R^2 de 0,9927. El resto de las microalgas también presentó una correlación elevada; *TLU*: 0,9515; *ANA*: 0,9425; *SPG*: 0,9315. El caso de menor correlación es el de *NAN*, cuyo valor es de 0,8816.

Tabla 5. Ecuaciones lineales resultantes al graficar la liberación de equivalentes de leucina y CDP.

	Relación OPA/CDP	Valor Crítico de F
<i>NAN</i>	$y = 2,8221x - 3,8055; R^2 = 0,8816$	0,0179
<i>CHL</i>	$y = 3,0542x + 0,4891; R^2 = 0,9927$	0,0003
<i>SPG</i>	$y = 3,5894x - 3,3503; R^2 = 0,9315$	0,0078
<i>ANA</i>	$y = 2,5039x + 5,9816; R^2 = 0,9425$	0,0059
<i>TLU</i>	$y = 2,8999x + 7,2860; R^2 = 0,9515$	0,0046

Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*.; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*.

Finalmente, la Figura 4A representa la evolución de la liberación de azúcares reductores a lo largo de los 90 minutos de hidrólisis. Los resultados obtenidos evidenciaron una escasa descomposición de la pared celular de las microalgas obteniéndose valores inferiores a 5g de equivalentes de glucosa libre por cada 100g de biomasa de microalgas al final de los 90 minutos de hidrólisis enzimática.

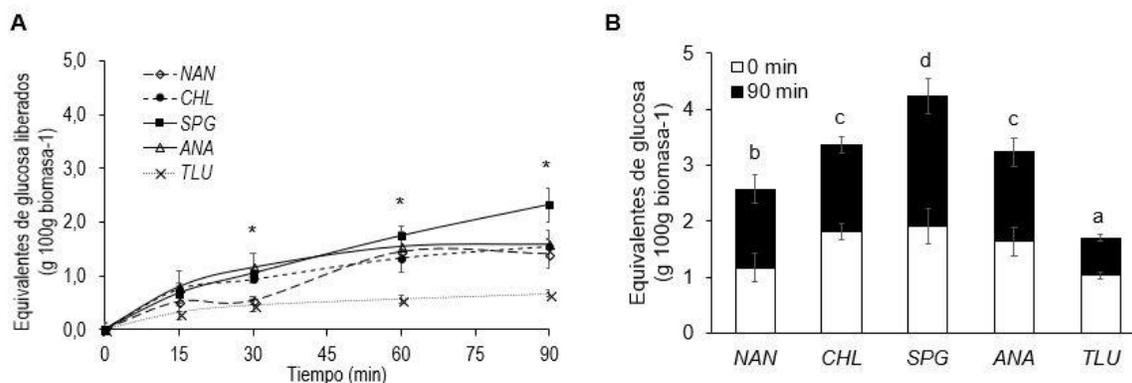


Figura 4: Evolución de la liberación de azúcares reductores de las diferentes microalgas analizada durante la hidrólisis enzimática. Códigos: *NAN*: *N. gaditana*; *CHL*: *C. vulgaris*.; *SPG*: *Spirogyra* sp.; *ANA*: *Anabaena* sp.; *TLU*: *T. lutea*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas materias proteicas ensayadas para un mismo tiempo de muestreo ($p < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

Algunas especies de microalgas tienen potencial para reducir la dependencia de las materias primas convencionales utilizadas en nutrición acuícola debido principalmente a su contenido en proteínas, lípidos, vitaminas y carotenoides (Shah *et al.*, 2018). Su valor nutricional viene determinado por su tamaño y forma celular, su digestibilidad, producción de compuestos tóxicos y su composición química (Brown *et al.*, 1997).

La composición química de las microalgas, incluyendo la composición de aminoácidos y ácidos grasos, y los contenidos de vitaminas y minerales, ha sido previamente estudiada (Becker, 2007; Kent *et al.*, 2015; Tibbetts *et al.*, 2015). En general, el valor nutricional de las microalgas está determinado principalmente por su contenido de proteína y su perfil de aminoácidos y, en segundo lugar, por el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en ácidos grasos polinsaturados (EPA, ARA y DHA) (Reitan *et al.*, 1997). Los datos obtenidos tras la determinación del contenido en proteína cruda mostraron niveles relativamente altos (>30%, MS) en la mayoría de las especies estudiadas, obteniéndose valores superiores a los observados en fuentes de proteína de origen vegetal comúnmente utilizadas en alimentación acuícola (véase Ayadí *et al.*, 2012). En general, resulta complicado comparar el contenido en proteína cruda con el observado en trabajos previos debido principalmente a que la composición química de las microalgas varía notablemente en función de las condiciones de cultivo empleadas. De hecho, el contenido en proteína cruda obtenido en las microalgas analizadas difiere del obtenido en trabajos previos como Becker (1994), Andrés *et al.* (1992) o Henry *et al.* (2012).

Para las microalgas, el valor nutricional de la proteína viene determinado por su composición en aminoácidos esenciales (Webb y Chu, 1983). En general, la composición de aminoácidos de las microalgas presenta un alto contenido en aminoácidos esenciales, como se ejemplifica en un estudio exhaustivo de 40 especies de microalgas de siete clases diferentes en el que todas las especies mostraron una composición de aminoácidos similar (Brown *et al.*, 1997). Como es característico de las microalgas, el aspartato y el glutamato junto con la tirosina alcanzaron los niveles más altos de los NEAA. En cuanto al contenido

en EAA, se observó un elevado contenido en arginina (8,7-9,1%, MS), el cual es indispensable en dietas para peces (Li *et al.*, 2008). La arginina puede estimular la liberación de varias hormonas, tales como la insulina, la hormona del crecimiento y el glucagón. De hecho, en peces, la arginina es un activador de la liberación de insulina incluso más potente que la glucosa (Mommensen *et al.*, 2001). La lisina y la metionina suelen ser a menudo los AA más limitantes en los ingredientes utilizados para la producción de piensos para acuicultura, especialmente cuando la harina de pescado es reemplazada por fuentes de proteína de origen vegetal como la harina de soja, lino o girasol (Mai *et al.*, 2006 a,b; Tibetts *et al.*, 2015). Según NRC (1994), los niveles (% de MS) para estos aminoácidos rondan el 1.2-2.2% para lisina y el 0.6-1.5% para metionina, mientras que los resultados obtenidos en las microalgas analizadas en el presente trabajo han sido de 5.5-5.9% (lisina) y 5,1-6,1% (metionina). Por lo tanto, y en base a las necesidades de aminoácidos en peces cultivados descritas (Wilson, 2003), la biomasa de microalgas podría ser capaz de proporcionar la mayoría de los aminoácidos esenciales necesarios para un adecuado desarrollo del animal.

Otro aspecto importante para tener en cuenta a la hora de valorar la calidad de los ingredientes utilizados en la elaboración de piensos animales es su contenido en lípidos y su perfil de ácidos grasos. Los lípidos de las microalgas son ricos en ácidos grasos omega-3 (Brown *et al.*, 1997). Sin embargo, la composición de ácidos grasos es ampliamente variable y está asociada con la intensidad de la luz, los medios de cultivo, la temperatura y el pH (Daroch *et al.*, 2013).

Además de su composición química, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la evaluación de nuevos ingredientes para su utilización en alimentación acuícola es la presencia de factores antinutritivos que puedan interferir en los procesos de digestión y absorción a nivel intestinal (Alarcón *et al.*, 1999). Algunos de los más comunes son los inhibidores de proteasa, lectinas, ácido fítico y saponinas (Murray *et al.*, 2010), los cuales pueden causar efectos adversos sobre los procesos de digestión y absorción de la proteína, contrarrestar la función de las vitaminas e incluso limitar la palatabilidad del alimento (Gatlin *et al.*, 2007; Krogdahl *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2010). En este sentido, los

resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron unos niveles de inhibición de la actividad proteolítica intestinal por debajo del 20% en *CHL* y *SPG* y por debajo del 10% en *NAN* y *TLU*, siendo necesarios niveles de inclusión en pienso muy elevados para ello. Estos resultados contrastan con la elevada capacidad de inhibición de la actividad proteasa observada en fuentes de proteína de origen vegetal (Alarcón *et al.*, 2001a) o algunas especies de macroalgas como *Ulva rigida* (Sáez *et al.*, 2013).

Otro de los factores fundamentales a la hora de evaluar la viabilidad de nuevos ingredientes para su utilización como ingredientes y/o aditivos en nutrición acuícola es la determinación de la digestibilidad (Alarcón *et al.*, 2002). En este sentido, la simulación *in vitro* de los procesos de digestión ha sido utilizada con anterioridad para evaluar el potencial de diferentes materias primas como ingrediente en nutrición acuícola (Moyano *et al.*, 2014).

La evaluación de la hidrólisis proteica *in vitro* mediante técnicas electroforéticas ha sido anteriormente utilizada en otras especies de acuicultura (Alarcón *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 2010; Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2011) y permite obtener una información cuantitativa acerca de la degradación de las proteínas por las enzimas digestivas de la especie considerada. El análisis de los proteinogramas mostró que las proteínas de las microalgas evaluadas son hidrolizadas por las proteasas digestivas de ejemplares juveniles de dorada. Por lo general se observó 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 de dorada sugieren una biodisponibilidad razonablemente alta de la proteína contenida en la biomasa de microalgas.

La susceptibilidad de una proteína para ser hidrolizada por las proteasas digestivas viene determinada por una serie de factores, entre los que se encuentra la complejidad estructural y el perfil de aminoácidos (Tibetts *et al.*, 2017). Sin embargo, esta teoría no explica las diferencias en las tasas de hidrólisis observadas. De acuerdo con Tibetts *et al.* (2016), la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos no polares en las proteínas de algas en comparación con las proteínas vegetales podría estar correlacionada con una

menor solubilidad y digestibilidad de las microalgas. Desafortunadamente, el diseño experimental del presente estudio no permite determinar la complejidad estructural de la proteína de microalgas.

Por otro lado, diversos autores sostienen la idea de que las diferencias observadas en la digestibilidad de la proteína presente en estos microorganismo puede estar claramente influenciada, diferencias en la accesibilidad a las proteínas causadas por diferentes matrices de paredes celulares o diferencias en las especies de peces (Teuling *et al.*, 2017; Sarker *et al.*, 2016; Gong *et al.*, 2017). Existe una gran diversidad en las estructuras de la pared celular de microalgas y cianobacterias: desde las paredes celulares de peptidoglicanos hasta las paredes celulares celulósicas (Palinska y Krumbein, 2000; Scholz *et al.*, 2014). La presencia de estas paredes celulares ricas en celulosa y otros componentes sumada a la escasa producción de enzimas celulolíticas por parte de la mayoría de los peces (Evans y Claiborne, 1997), dificultan el acceso a los nutrientes, lo que conduce a una disminución de la digestibilidad de los nutrientes (Gerken *et al.*, 2013; Safi *et al.*, 2013).

En este sentido, la gruesa pared celular de algunas presente en las especies del género *Chlorella* o *Nannochloropsis* (Shah, 2018; Scholz *et al.*, 2014) podría ser el motivo de los menores valores de degradación proteica observados en *CHL* y *NAN*. Del mismo modo se explicaría los altos niveles de CDP observados en *TLU*. A pesar de la escasez de información acerca de la pared celular de esta microalga, Tibaldi *et al.* (2015) llegaron a la conclusión de que la pared celular de esta microalga es muy delgada y fácilmente degradable

Para concluir, los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones realizadas revelaron una amplia variabilidad en la composición química de las microalgas analizadas. En general, su adecuado contenido en proteína con una composición equilibrada de aminoácidos junto con su capacidad para ser hidrolizadas por las proteasas digestivas de dorada confirma el potencial de las microalgas *N. gaditana*, *C. vulgaris*, *Spirogyra* sp., *Anabaena* sp y *T. lutea* para su uso como ingrediente en nutrición acuícola.

6. CONCLUSIONES

1. Las microalgas analizadas mostraron un alto contenido de proteína, con una adecuada composición en aminoácidos esenciales, destacando particularmente el contenido en metionina y lisina.
2. El ensayo de digestibilidad *in vitro* se establece como una herramienta útil para valorar digestibilidad y calidad de cualquier ingrediente que se pueda incluir en un pienso. Los valores del coeficiente de degradación proteica y de la liberación de aminoácidos obtenidos confirman que la proteína de las microalgas estudiadas puede ser hidrolizada por las enzimas digestivas de dorada.
3. Los ensayos de inhibición revelaron escasa capacidad de las microalgas para inhibir a las proteasas digestivas de dorada, comprobándose que el grado de inhibición es dosis dependiente. A pesar de ello, se requerirían niveles de inclusión muy altos en los piensos para observar estos efectos negativos.
4. En general, la biomasa de *N. gaditana*, *C. vulgaris*, *Spirogyra* sp., *Anabaena* sp. y *T. lutea* puede ser utilizada como ingrediente en alimentación de peces cultivados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, F. J., Díaz, M., Moyano, F. J., Abell, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(3): 257-267.
- Alarcón, F. J., Moyano, F. J., Díaz, M. (2001b). Use of SDS-pages in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. *Aquaculture International* 9: 255-267.
- Alarcón, F. J., Moyano, F. J., Díaz, M. (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7): 697-704.
- Alarcón F. J., Diaz M., Moyano F. J. (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat Living Resources* 12: 233-238.
- Alarcón, F. J., García-Carreño, F. L., Del Toro, M. N. (2001a). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish physiology and Biochemistry*, 24(3): 179-189.
- Andrés, M., Conejeros, R., López, L., Lutz, M. (1992). Evaluation of marine microalga *Nannochloropsis sp.* as a potential dietary supplement. Chemical, nutritional and short term toxicological evaluation in rats. *Nutrition Research*, 10 (10): 1273-1284.
- Atalah, E., Cruz, C. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A., Robaina, L. (2007). Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorntutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 270: 178-185.
- Ayadi, F. Y., Rosentrater, K. A., Muthukumarappan, K. (2012). Alternative protein sources for aquaculture feeds. *Journal of Aquaculture Feed Science Nutrition*, 4(1): 1-26.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2): 207-210.
- Bosch, L., Alegría, A., Farré, R. (2006). Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography B*, 831(1-2): 176-183.
- Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

- Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3: 281-292.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkmann, J. K., Dunstan, G. A. (1997). Nutrition properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Cardinaletti, G., Messina, M., Bruno, M., Tulli, F., Poli, B. M., Giorgi, G., Chini-Zittelli, G., Tredici, M., 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. *Biotechnology advances*, 25(3): 294-306.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., Catignani, G. (1983). Spectrophotometric assay using ophthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66: 1219-1227.
- Council, N. R. (1994). Nutrient requirements of poultry. Washington, DC, National Academic Press). ORTIZ, LT, REBOLÉ, A., ALZUETA, C, RODRÍGUEZ, ML & TREVIÑO, J. (2001) Metabolisable energy value and digestibility of fat and fatty acids in linseed determined with growing broiler chickens. *British Poultry Science*, 42 57-63
- Daroch, M., Geng, S., Wang, G. (2013). Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, 102: 1371-1381.
- de Cruz, C. R., Lubrano, A., Gatlin III, D. M. (2018). Evaluation of microalgae concentrates as partial fishmeal replacements for hybrid striped bass *Morone* sp. *Aquaculture*, 493: 130-136
- de la Higuera, M., Cardenete, G. (1987). Fuentes alternativas de proteína y energía en acuicultura. *Alimentación en Acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT)*. Madrid, España. Industria Gráfica, SL
- Evans, D. H., Claiborne, J. B. (1997). *The Physiology of Fishes*, second edition. Taylor & Francis.
- FAO, I. (2016). WFP (2015), *The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress*. Food and Agriculture Organization Publications, Rome.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Ganuja, E., Benítez-Santana, T., Atalah, E., Vega-Orellana, O., Ganga, R., Izquierdo, M. S. (2008). *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived

- oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*, 277(1-2): 109-116.
- Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E. J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*, 38(6): 551-579.
- Gerken, H. G., Donohoe, B., Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237(1): 239-253.
- Gong, Y., Guterres, H. A. D. S., Huntley, M., Sørensen, M., Kiron, V. (2018). Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. when fed to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 24(1): 56-64.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8): 1737-1746.
- Henry, E.C. (2012). The use of algae in fish feeds as alternative to fish meal. *Aquaculture International*, 15 (5): 10-13.
- Kent, M., Welladsen, H. M., Mangott, A., Li, Y. (2015). Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PloS one*, 10:2 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118985>
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3): 333-344.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lepage, G., Roy, C. C., (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25(12): 1391-1396.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4): 629-636.
- Li, Z. Y., Youravong, W., Aran, H. (2010). Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: a comparative study with commercial proteases. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1): 166-172.
- Li, Z., Aran, H., Youravong, W. (2009). Purification of protease from pre-treated tuna spleen

- extract by ultrafiltration: An altered operational mode involving critical flux condition and diafiltration. *Separation and Purification Technology*, 66(2): 368-374.
- López, C. V. G., García, M. D. C. C., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19): 7587-7591.
- Lozano, N. B. S., Vidal, A. T., Martínez-Llorens, S., Mérida, S. N., Blanco, J. E., López, A. M., Torres, M. P., Cerdá, M. J. (2007). Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal. *Aquaculture*, 272(1-4): 528-534.
- Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J., Martínez, F. J. (2009). Alimentación en piscicultura. En: La nutrición y alimentación en piscicultura (Ed.) Sáenz F. Madrid, pp. 697-753.
- Mai, K., Wan, J., Ai, Q., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, L., Zhang, C., Li, H. (2006b). Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture*, 253(1-4): 564-572.
- Mai, K., Zhang, L., Ai, Q., Duan, Q., Zhang, C., Li, H., Wan, J., Liufu, Z. (2006a). Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 258:1-4 535-542
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31(3): 426-428.
- Mommsen, T. P., Moon, T. W., Plisetskaya, E. M. (2001). Effects of arginine on pancreatic hormones and hepatic metabolism in rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(5): 668-678.
- Moyano, F. J., Saénz de Rodrigáñez, M. A., Díaz, M., Tacon, A. G. (2015). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 7(4): 223-242.
- Murray, H. M., Lall, S. P., Rajaselvam, R., Boutilier, L. A., Blanchard, B., Flight, R. M., Colombo, S., Mohindra, V., Douglas, S. E. (2010). A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture*, 298(3-4): 282-293.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburg, R. J., Hua, K., Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36): 15103-15110.
- Palinska, K. A., Krumbein, W. E. (2000). Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 36(1): 139-145.

- Percival, E. E., Turvey, J. R. (1974). Polysaccharides of algae. CRC, handbook of microbiology, condensed edition, 532nd ed, ed. AL Laskin, and HA Lechevalier. Cleveland: CRC Press Inc.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G., Olsen, Y. (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155(1-4): 207-221.
- Robin, J. H., Vincent, B. (2003). Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture*, 225(4): 463-474
- Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E. H., García, J. L., López, D. (1998). Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology Techniques*, 12(9): 689-691.
- Sáenz de Rodrigáñez, M. Á., Medina, E., Moyano, F. J., 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. *Aquaculture Research*, 42(11): 1639-1652.
- Sáez, M. I., Martínez, T. F., Alarcón, F. J. (2013). Effect of the dietary of seaweeds on intestinal proteolytic activity of juvenile sea bream, *Sparus aurata*. *International Aquafeed*, 16(2): 38-40.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P. Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of applied phycology*, 25(2): 523-529.
- Sarker, P. K., Gamble, M. M., Kelson, S., Kapuscinski, A. R. (2016). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquaculture nutrition*, 22(1): 109-119.
- Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M. C., Gerken, H. G. (2014). Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic cell*, doi:10.1128/EC.00183-14
- Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M. K., Parsaeimehr, A., Liang, Y., Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1): 197-213.
- Teuling, E., Wierenga, P. A., Schrama, J. W., Gruppen, H. (2017). Comparison of protein extracts from various unicellular green sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(36): 7989-8002.

- Tibaldi, E., Chini Zittelli, G., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M. R., Poli, B. M. (2015) Growth of *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) muscle. *Food Chemistry*, 153(3): 27-333.
- Tibbetts, S. M., MacPherson, T., McGinn, P. J., Fredeen, A. H. (2016). In vitro digestion of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for monogastric and ruminant animal feed applications. *Algal Research*, 19: 324-332.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of applied phycology*, 27(3): 1109-1119.
- Tibbetts, S. M., Yasumaru, F., 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 Research*, 21: 76-80.
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., -Aguilar, C. N., Fernandes, B. D., Ruiz, H. A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Research Journal*, 5: 780-791.
- Venkataraman, L. V., Becker, E. W. (1985). *Biotechnology and utilization of algae: the Indian experience*. Department of Science & Technology and Central Food Technological Research Institute, Mysore, India.
- 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., 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., Mendes, S. I., Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F. L., Abdala, R., Moriñigo, M. A., Mancera, J. M., Alarcón, F. J. (2016). Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture research*, 47(10): 3224-3238.
- Vizcaíno, A. J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M. I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., 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 physiology and biochemistry*, 44(2): 661-677.
- Webb, K. L., Chu, F. L. E., Pruder, G. D., Langdon, C., Conklin, D. (1983). *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition* October 1981, Rehoboth Beach.