



Resumen en extenso

Efectos de la inclusión de alverjón (*Vicia narbonensis*) en las dietas de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): hacia una acuicultura más sostenible.

Toledo-Solís, F.J. ^{1*}, Tomás-Almenar, C.¹, Larrán, A.M.¹, De Mercado, E.², Alarcón, F.J.³, Rico, D.⁴, Martín-Diana, A.B.⁴, Fernández, I.².

¹ Aquaculture Research Center, Agro-Technological Institute of Castilla y León (ITACyL), Ctra. Arévalo, 40196 Zamarramala, Segovia, Spain.

² Pig Research Center, Agro-Technological Institute of Castilla y León (ITACyL), Ctra. Ríaza Toro S-N, 40353 Hontalbilla, Segovia, Spain.

³ Department Biology and Geology, Ceimar-University of Almería 04120 Almería, Spain.

⁴ Agro-Technological Institute of Castilla y León (ITACyL), Ctra. de Burgos Km.119, Finca Zamadueñas, 47071 Valladolid, Spain.

*E-mail: nacfm@hotmail.com



Cite this paper/Como citar este artículo: Toledo-Solís, F. J., Tomás-Almenar, C., Larrán, A. M., De Mercado, E., Alarcón, F. J., Rico, D., Martín-Diana, A. B., Fernández, I. (2021). Efectos de la inclusión de alverjón (*Vicia narbonensis*) en las dietas de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): hacia una acuicultura más sostenible. *Revista Bio Ciencias* 8: (Suppl) Memorias del 3er Coloquio de Nutrigenómica y Biotecnología Acuícola 2020 (CONYBA) e1102. <http://doi.org/10.15741/revbio.08Suppl.e1102>

Resumen

La sostenibilidad de la acuicultura se basa en la identificación e inclusión de materias primas alternativas. Aunque recientemente se están probando otras harinas, pero la harina de origen vegetal es la principal candidata para sustituir la harina de pescado. Por ello, los efectos de la inclusión de 0 (Control), 10 (A10) y 30% (A30) de harina de alverjón (*Vicia narbonensis*) en dietas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se evaluaron en un ensayo dosis-respuesta durante 63 días por triplicado, con 25 juveniles por tanque de 500 L. La harina de alverjón *in vitro* disminuyó la actividad intestinal de la proteasas totales, pero al aumentar la temperatura se reduce el efecto de los factores anti-nutricionales. No hay diferencias en el crecimiento de los peces, ni alteraciones histopatológicas graves en el intestino proximal con inclusión de 10% de alverjón en la dieta. Por el contrario, la inclusión de 30% de harina de alverjón generó un déficit en el crecimiento (reducción del 30% en el crecimiento final) y alteraciones histopatológicas graves (ej. alto número de fusión de vellosidades y reducción de la densidad de células goblet, entre otros). Además, mientras que la dieta A30 disminuyó el contenido de ácidos grasos (AG) saturados en los filetes de pescado, la dieta A10 mejoró el contenido de AG monoinsaturados en comparación con la del grupo de control. Los

resultados muestran que es posible una inclusión baja (10%) de harina de alverjón en las dietas de trucha arcoíris.

Abstract

Aquaculture's sustainability deeply relies on the identification and inclusion of alternative raw materials. Although other sources are being recently tested, the meal from terrestrial vegetable species is still the main candidate to substitute fish meal. Here, the effects of 0 (Control), 10 (A10) and 30% (A30) inclusion of Narbonne vetch (*Vicia narbonensis*) meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets was assessed in a 63-days dose-response trial in triplicates, with 25 rainbow trout juveniles per 500 L tank. Narbonne vetch meal decreased total intestine protease activity *in vitro*, although high temperature partially reduce the activity of anti-nutritional factors. No differences in fish growth performance and no severe histopathological alterations on the proximal intestine were observed when a 10% Narbonne vetch inclusion was assessed. In contrast, high inclusion (30%) of Narbonne vetch led to poor growth performance (30% reduction on final growth) and severe histopathological alterations (e.g. high number of villi fusion and reduced goblet cells density, among others). Furthermore, while A30 diet decreased saturated fatty acids (FAs) content in fish fillets, A10 diet improved

monounsaturated FAs content when compared to that of Control group. Present results show as a low inclusion (10%) of Narbonne vetch in rainbow trout diets is possible.

Introducción

La producción de organismos acuáticos ha pasado de 35.6 a 82.1 millones de ton. entre 2000 y 2018, y aún debe incrementarse para hacer frente a las demandas de la población humana. La harina y el aceite de pescado, son materias primas que cubren el requerimiento nutricional de los peces, pero son fuentes limitadas. Por ello, en la última década se han llevado a cabo esfuerzos en investigación para identificar e implementar nuevas materias primas alternativas para la sostenibilidad del sector acuícola. En este sentido, la proteína de origen vegetal está considerada entre las más prometedoras para sustituir la harina de pescado, aun conteniendo factores anti-nutricionales (FANs). El cultivo de alverjón (*Vicia narbonensis*) es característico de regiones del Mediterráneo de poca lluvia y/o en climas semi-áridos. Este cultivo necesita poco cuidado, es resistente a plagas (aves), crece rápidamente en invierno y el rendimiento en grano es de aprox. 1.50 ton/ha. La semilla de alverjón contiene aprox. 28% de proteína cruda y un perfil de aminoácidos medianamente balanceado. Es considerada una proteína de bajo costo y es destinada principalmente para la alimentación animal, con el fin de reducir la dependencia de la soya. Se ha estudiado su inclusión en dietas para pollos, bovinos, cerdos y en peces. En estos últimos solo se ha realizado un ensayo previo y particularmente en tilapia (*Oreochromis niloticus*), con inclusiones de hasta el 40% (Buyukcapar *et al.*, 2010). Actualmente, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es uno de los modelos biológicos mayormente utilizados en acuicultura para probar ingredientes alternativos para la elaboración de alimentos, como es el remplazo de harina y aceites de pescado por materias vegetales, minerales y enzimas exógenas, entre otros. Además, el cultivo de la trucha a nivel mundial es uno de los más importantes y para el 2018 alcanzó las 848,100.00 toneladas. En el presente trabajo se probó la inclusión de alverjón (*V. narbonensis*) variedad ZV-156, en dietas para evaluar el crecimiento y la fisiología de la trucha arcoíris y por tanto, su utilización en alimentos de organismos acuáticos.

Materiales y métodos

Diseño y condiciones experimentales: Las dietas experimentales incluyeron niveles incrementales de harina de alverjón: 0% (Dieta Control), 10% (Dieta A10) y 30% (Dieta A30). Las dietas se formularon isoprotéicas (43%) e isolipídicas (18%), suplementadas con metionina y en pellets extrusionados de 2-3 mm. El experimento se realizó en el Centro de Investigación Acuícola (ITACyL, Segovia, España), con 25 truchas

arcoíris hembras por tanque (asignadas al azar) de peso promedio de 26.8 ± 0.7 g y longitud total (LT) de 13.4 ± 0.1 cm. El experimento se hizo por triplicado, con 9 tanques cilíndricos de fibra de vidrio (500 L) conectados a un sistema de recirculación. Los peces se alimentaron manualmente a saciedad aparente una vez al día (con un máximo del 3% de ingesta diaria de alimento) durante 63 días. Durante el bioensayo se mantuvieron las siguientes condiciones: temperatura del agua (15 ± 1 °C), oxígeno disuelto ($>7 \pm 1$ mg/L) y fotoperiodo (12:12 h luz:oscuridad). Las concentraciones de amonio y nitrito en el agua se monitorearon diariamente para mantenerlas por debajo de los valores tóxicos.

Inhibición de la actividad enzimática por harina de alverjón: La inhibición de la actividad de proteasas totales *in vitro* se determinó de acuerdo a Alarcón *et al.* (1999). Se muestrearon intestinos de 10 truchas arcoíris con peso aprox. de 30 g y prepararon los extractos enzimáticos. La inhibición de actividad de proteasas alcalinas se midió con cantidades crecientes de μ g harina de alverjón por Unidades de actividad (UA). También se pre-trató la harina de alverjón a 60, 80 y 100 °C durante 30 min (simulando el proceso de extrusión) y la subsecuente inhibición de las dietas Control, A10 y A30.

Cálculo de los índices de performance: Se evaluaron los índices de crecimiento, ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento instantánea (TCI), índice de conversión (IC), e índice hepatosomático (IH).

Análisis químicos e histopatología: El contenido de ácidos grasos en filetes de trucha arcoíris se determinó por el método de Bligh & Dyer, (1959). Y la digestibilidad aparente de la proteína se determinó utilizando cenizas insolubles en ácido como marcador en las heces de acuerdo a lo descrito por Atkinson *et al.*, (1984), y se calculó de la siguiente manera: $\text{CDA proteína (coeficiente de digestibilidad aparente de proteína)} = [100 - (\text{marcador en dieta} / \text{marcador en heces}) \times (\% \text{ proteína en heces} / \% \text{ proteína en dieta})] \times 100$. Al finalizar el experimento, de 3 peces por tanque se muestrearon, tomándose y fijándose porciones de intestino proximal con paraformaldehído tamponado al 4%, y se deshidrataron con alcoholes al 25, 50, 75 y 100%. Tras su inclusión en parafina y corte histológico a 3-5 μ m), las muestras se tiñeron con soluciones de hematoxilina-eosina y azul alcian (AB, pH = 2,5) y ácido periódico de Schiff (PAS). Todos los procedimientos se realizaron como se describe en Pearse, (1985), utilizando un microscopio Olympus CX31 acoplado con cámara Olympus EP50 para su observación y evaluación.

Análisis estadísticos: Los resultados se compararon mediante ANOVA de una vía y con

Tukey como prueba posterior. El nivel de significancia se fijó en $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Inhibición de la actividad enzimática: La actividad de la proteasas totales *in vitro* en la trucha arcoíris fue directa y proporcionalmente inhibida por la mayor presencia de harina de alverjón. La adición de 50 μg de harina de alverjón/UA indujo una inhibición del $26.81 \pm 8.92\%$ de la actividad enzimática, y la adición de 400 μg /UA un 48% de inhibición. Con el pre-tratamiento térmico se disminuyó el efecto de la inhibición de la harina de alverjón al aumentar la temperatura (un 50% a 100°C). En las dietas experimentales, la dieta A30

con 165 μg /UA genera una inhibición mayor de la actividad enzimática que las dietas Control y A10.

Crecimiento e índices de performance: En la tabla 1 se muestra el crecimiento y los índices analizados en trucha arcoíris al finalizar el bioensayo. La dieta A30 disminuyó el crecimiento (peso 96.33 ± 1.03 g y LT 19.23 ± 0.18 cm) de la trucha arcoíris con respecto a las alimentadas con la dieta A10 (125.04 ± 10.27 g, 21.14 ± 0.68 cm) y la dieta Control (137.24 ± 4.16 g, 21.85 ± 0.23 cm).

La dieta A10 únicamente modificó el factor de conversión alimenticia, aumentando aprox. en un 5% con respecto a la dieta Control. En el caso, de las truchas alimentadas con la dieta A30, la mayoría de los índices medidos son diferentes al compararse con la dieta Control.

Tabla 1. Índices de crecimiento, somático, coeficientes de digestibilidad de proteínas aparentes de las dietas y análisis proximal y contenido lipídico en filetes de truchas arcoíris alimentadas con dietas experimentales incluyendo harina de alverjón. Los valores se expresan en media \pm desviación estándar. Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA, $P < 0.05$; $n = 3$). Pi, peso inicial; Ltí, longitud total; Pf, Peso final; Ltf, longitud total final; FC, factor de condición; GP, ganancia en peso; TCI, tasa de crecimiento instantánea; IC, índice de conversión; IH, índice hepatosomático; CDAproteína, coeficiente de digestibilidad aparente de proteína.

Días	Parámetros	Control	A10	A30
0	Pi (g)	26.81 ± 0.49	26.03 ± 1.29	27.46 ± 0.24
	Lti (cm)	13.59 ± 0.26	13.15 ± 0.24	13.61 ± 0.36
63	Pf (g)	137.24 ± 4.16^a	125.04 ± 10.27^a	96.33 ± 1.03^b
	Ltf (cm)	21.85 ± 0.23^a	21.14 ± 0.68^a	19.23 ± 0.18^b
	GP (%)	411.90 ± 10.56^a	380.16 ± 24.51^a	250.83 ± 2.46^b
	TCI (%/día)	2.59 ± 0.03^a	2.49 ± 0.08^a	1.96 ± 0.01^b
	IC	0.78 ± 0.01^c	0.83 ± 0.02^b	1.07 ± 0.00^a
	IH (%)	1.06 ± 0.09^b	1.04 ± 0.09^b	1.27 ± 0.09^a
Digestibilidad de la proteína aparente (%)				
CDAproteína		93.72 ± 0.39^a	85.11 ± 3.83^a	72.21 ± 6.15^b
Contenido de ácidos grasos en musculo (%)				
Σ Saturados		48.64 ± 0.24^a	45.50 ± 1.11^b	45.71 ± 0.74^b
Σ Monoinsaturados		31.27 ± 0.50^b	33.13 ± 0.88^a	33.20 ± 0.18^a
Σ Poliinsaturados		20.08 ± 0.34	21.37 ± 1.79	21.09 ± 0.77
n-3/n-6		1.02	0.99	0.98

Digestibilidad aparente, análisis proximal y contenido de ácidos grasos: La digestibilidad aparente de la proteína solo se vio reducida significativamente con la inclusión del 30% de

harina de alverjón (Tabla 1), sin llegar a modificar el contenido de proteína en el músculo del pez (resultado no mostrado). También en la Tabla 1 se muestra el contenido de ácidos grasos del

músculo de las truchas alimentadas con las dietas experimentales. La inclusión del 10 y 30% de harina de alverjón reduce el contenido de ácidos grasos saturados y mejora el contenido de ácidos grasos monoinsaturados con respecto a los peces alimentados con la dieta Control. El contenido de

ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) no fue afectado.

Histopatología: Los resultados del análisis histopatológico del intestino proximal de trucha arcoíris se muestra en la Figura 1.

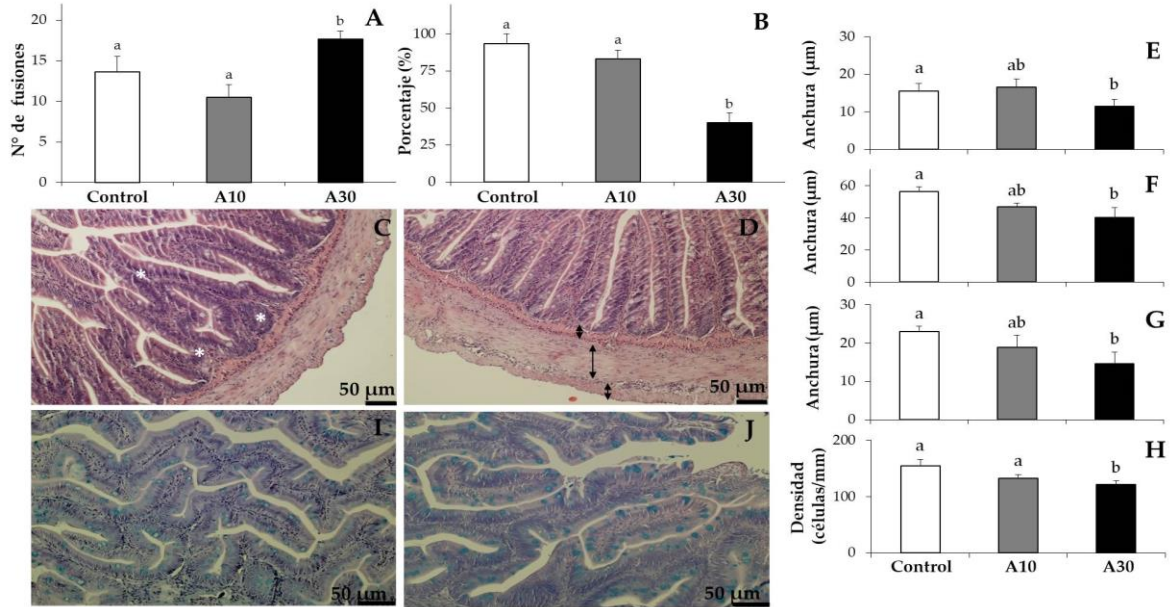


Figura 1. Análisis histopatológico del intestino proximal ($p < 0.05$, $n = 3$), Dietas = Control, A10 y A30. A = nº de fusión de vellosidades. B = integridad del borde del cepillo, C = nº de fusión de vellosidades en truchas alimentadas con dieta A30, D = nº de fusión de vellosidades en truchas alimentadas con dieta Control. E = Ancho de la capa submucosa (μm), F = Ancho de la capa muscular (μm), G = Ancho de la capa serosa (μm), H = células goblet, I = células goblet en truchas alimentadas con la dieta A30, J = células goblet en truchas alimentadas con dieta Control. Asteriscos (en C) muestran fusión de vellosidades, las flechas (en D) indican el ancho de la capa submucosa, muscular y serosa.

La dieta A30 afectó al número de fusiones de vellosidades (17.67 ± 1.00) y la integridad del borde en cepillo (40.00 ± 6.67 %). No se encontraron diferencias en estos parámetros entre la dieta A10 (10.50 ± 1.59 , 83.33 ± 5.77 %, respectivamente) y la dieta Control (13.67 ± 1.86 , 93.33 ± 6.67 %, respectivamente; Fig. 1A, B). También la dieta A30 afectó el ancho de las capas de la pared intestinal de la submucosa (11.45 ± 1.85 μm), muscular (40.05 ± 6.09 μm) y serosa (14.57 ± 3.05 μm ; Fig. 1E, F, G) y la densidad de las células goblet (121.14 ± 6.84 células/mm; Fig. 1H). La dieta A10 no generó diferencias en las capas de la pared intestinal (submucosa 16.65 ± 2.11 μm , muscular 46.91 ± 2.04 μm y serosa 18.86 ± 3.25 μm) y en la densidad de células goblet (132.40 ± 6.85 células/mm), con respecto a lo encontrado en la dieta Control (submucosa 15.57 ± 2.06 μm , muscular 56.57 ± 2.99 μm , serosa 23.09 ± 1.41 μm ; células goblet 154.49 ± 12.18 células/mm). Otros parámetros como es la altura de las vellosidades, la altura de los enterocitos, el grado de vacuolización supranuclear y la posición del núcleo de los

enterocitos no han sido afectados por la inclusión de alverjón en la dieta.

Discusión y conclusión

En los alimentos de distintas especies de peces cultivadas se ha remplazado entre 40-60% de harina de pescado con distintas harinas, mayormente vegetales como la soya. La inclusión de harinas vegetales en los alimentos se ven limitadas por el tipo y contenido de FANs. La harina de alverjón (variedad ZV-156) contiene FANs que inhiben hasta en un 48% (condiciones *in vitro*) la actividad de las proteasas totales de la trucha arcoíris, pero este efecto de inhibición se reduce (hasta 50%) con temperaturas ($< 100^\circ\text{C}$). En otras leguminosas también se ha reportado un grupo de FANs que son termoestables, y que afectan la actividad enzimática post-extrusión. Cuando la harina de alverjón es incluida en un 30% en los alimentos, los índices de crecimiento en trucha arcoíris son afectados, pudiendo esto estar relacionado con el contenido de FANs y la de digestibilidad de la proteína vegetal. Esta alta inclusión no afectó el valor nutricional de filete,

como es el contenido de proteína y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Sin embargo, se encontraron afectaciones en la histopatología del intestino proximal, como la pérdida de la integridad del borde en cepillo, alto número de fusiones de vellosidades, reducción de la densidad de células goblet y del ancho de las capas submucosa, muscular y serosa. En cambio, la inclusión del 10% de alverjón en las dietas de trucha arcoíris se ha mostrado segura para su fisiología, sin afectar el crecimiento y el rendimiento de los peces, la histopatología del sistema digestivo y/o el valor nutricional del filete. Además, la inclusión del 10% mejoró el contenido

de ácidos grasos monoinsaturados. Se necesitan investigaciones más detalladas para mejorar la digestibilidad mediante la implementación de pre-tratamientos para disminuir la presencia o actividad de los FANs y profundizar en las rutas moleculares por las cuales la alta inclusión de harina de alverjón afecta a la fisiología de los peces cultivados. Sin embargo, su producción local, alta disponibilidad comercial y bajo costo llevan a considerar la harina de alverjón como una de las materias primas alternativas más sostenibles para sustituir parcialmente la harina de pescado y/o la harina de soya en las dietas de peces.

Referencias

- Buyukcapar, H. M., Mezdegi, M. I. and Kamalak, A. (2010). Nutritive value of narbon bean (*Vicia Narbonensis*) seed as ingredient in practical diet for tilapia (*Oreochromis Niloticus*) fingerlings. *J. Appl. Anim. Res.*, 37(2): 253–256. <https://doi.org/10.1080/09712119.2010.9707135>
- Alarcón, F. J., Moyano, F. J. and Díaz, M. (1999). Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat. Living Resour.*, 12: 233–238. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(00\)86633-4](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(00)86633-4)
- Bligh, E. G. & Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*, 37: 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Atkinson, J. L., Hilton, J. W. and Slinger, S.J. (1984). Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1384–1386. <https://doi.org/10.1139/f84-170>
- Pearse, A. G. E. (1985) *Histochemistry. Theoretical and applied*, 4th ed.; Vol. 2 Analytical Technology, Churchill Livingstone. New York, USA, 1-624.