**FV.2.1. Informes oficiales de las analíticas**

**FV2.2. Informe del proceso de selección de los compuestos**

**ACTIVIDAD 2.**

**Análisis y Selección de los ingredientes alternativos**

**INFORME TÉCNICO**

**Acción 2.1. “****Análisis de la composición de los productos”.**

**Acción 2.2. “Selección de los ingredientes y requerimientos de corvina y trucha”.**

****

****

**PROYECTO ALTERNFEED**

**“Sustitución de harina y aceite de pescado por productos sostenibles**

**y subproductos alternativos”**

Contenido

[**2. DETALLE DEL DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD EJECUTADA** 1](#_Toc31719348)

[**2.1. Acción 2.1. Análisis de la composición de los productos** 1](#_Toc31719349)

[2.1.1. Análisis de proteínas 1](#_Toc31719353)

[2.1.2. Análisis de Grasa 1](#_Toc31719354)

[2.1.3. Análisis de ceniza 1](#_Toc31719355)

[2.1.4. Análisis de Humedad 1](#_Toc31719356)

[2.1.5. Análisis de aminas Biógenas 1](#_Toc31719357)

[2.1.6. Análisis de Minerales 1](#_Toc31719358)

[**2.2. Acción 2.2. Selección de los ingredientes y requerimientos de corvina y trucha** 2](#_Toc31719359)

[**3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD EJECUTADA** 3](#_Toc31719360)

[**3.1.** **Acción 2.1. Análisis de la composición de los productos** 3](#_Toc31719364)

[**3.2.** **Acción 1.2. Selección de los ingredientes y requerimientos de corvina y trucha** 5](#_Toc31719365)

[**4. RESULTADOS OBTENIDOS** 7](#_Toc31719366)

[**4.1. Acción 2.1. Análisis de la composición de los productos** 7](#_Toc31719367)

[4.1.1. Microalgas 7](#_Toc31719370)

[4.1.2. Agua de cocción 7](#_Toc31719371)

[4.1.3. Harina de insectos 7](#_Toc31719372)

[**4.2.** **Acción 2.2. Selección de los ingredientes y requerimientos de corvina y trucha** 7](#_Toc31719373)

[**5. CONCLUSIONES** 7](#_Toc31719374)

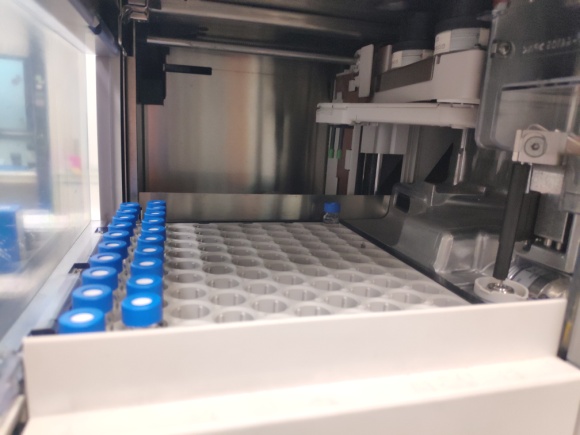
[**6. OBSTÁCULOS ENCONTRADOS DURANTE LA EJECUCIÓN** 7](#_Toc31719375)

[**7. BIBLIOGRAFÍA** 7](#_Toc31719376)

[**8. ANEXOS** 7](#_Toc31719377)

**1. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD PREVISTA**

A lo largo de la actividad 1 se han producido diferentes ingredientes alternativos basados en microalgas deshidratadas por spray-dry, agua de cocción y harina de insectos. En esta actividad se pretende evaluar la calidad nutricional de los ingredientes producidos. Por ello está previsto la caracterización de estos productos estimando sus composiciones en:

* Humedad
* Proteínas
* Cenizas
* Lípidos
* Perfil de ácidos grasos
* Aminograma
* Minerales: calcio, fósforo, cobre, hierro, zinc, manganeso, yodo y selenio.
* Metales pesados: plomo, mercurio, cadmio y arsénico.
* Aminas biógenas

Estos datos serán de gran importancia para la elección de los ingredientes que formarán parte de la formulación de las dietas.

Además se realizará en la tarea A.2.2 un estudio del estado del arte de los requerimientos nutricionales esenciales de los juveniles de trucha y corvina. Estos datos se pondrán en relieve para asegurar que los componentes elegidos se adecúan a lo que puede necesitar cada una de las dos especies.

# **2. DETALLE DEL DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD EJECUTADA**

## **2.1.** **Acción 2.1. Análisis de la composición de los productos**

En la actividad 1 se han generado 4 productos a base de microalgas (*Nannochloropsis gaditana*, *Tisochrysis lutea*, *Rhodomonas lens* e *Isochrysis galbana*), 2 productos del agua de cocción (una fracción lipídica y una fracción proteica) y dos harinas de insectos a base de larvas de Acheta *domesticus* y *Hermetia illucens.* Estos ingredientes han sido analizados para determinar la composición nutricional. En este apartado se detalla cada uno de los protocolos usados para el análisis de los compuestos esenciales y de interés para la toma de decisión a la hora de la selección del ingrediente.



### Análisis de proteínas

* Analizador elemental proteínas/nitrógeno LECO TruSpec (LECO, ST. Joseph, Michigan)
* Film de aluminio

El contenido en nitrógeno se analizó mediante el método de combustión Dumas, siguiendo el procedimiento del método 46.30.01 (AACC, 2012). Las muestras se envuelven en un film de aluminio y el nitrógeno es liberado por combustión a alta temperatura en oxígeno puro (analizador elemental proteínas/nitrógeno). Se utilizó el factor de conversión de nitrógeno a proteínas de 5 para las microalgas (Angell et al., 2016), 5,6 para la fracción proteica (Mæhre et al., 2018) y 6,25 para la harina de insecto (Yi et al., 2013; Zhao et al., 2016).

Para realizar el análisis del perfil de aminoácidos se usó un método para la detección y cuantificación de aminoácidos en alimentos y piensos por cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD con derivatización pre-columna. Se llevó a cabo una extracción mediante hidrólisis y son cuantificados mediante patrón externo. Los resultados se expresaron en % con respecto al total de la muestra

### Análisis de Grasa

* Balanza analítica
* Centrífuga
* Botes
* Extractor Soxhlet

La grasa bruta se analizó por gravimetría, de acuerdo con la norma ISO-1443. En primer lugar, se realizó una hidrólisis ácida de las muestras con ácido clorhidríco y una posterior extracción de la grasa con disolventes por el método Soxhlet (con éter de petróleo a temperatura ambiente y vacio). Finalmente, se pesa la grasa extraída.

En cuanto al perfil de Ac Grasos se realizado usando un Cromatógrafo gases-masas. se analizó por cromatografía de gases con detector de llama, tras la extracción de la grasa. El método usado se basa en la ISO-15304. Los resultados se expresan en % con respecto al total de ácidos grasos.

### Análisis de ceniza

* Cápsulas
* Mufla
* Balanza analítica

El contenido en cenizas se analizó mediante gravimetría de acuerdo con el método ISO R-936. Se pesó aproximadamente 5 g de cada muestra en cápsulas y se incineraron a 550ºC en una mufla hasta obtener cenizas blancas. Finalmente, se atemperó la muestra en el desecador y se volvió a pesar.

### Análisis de Humedad

* Estufa eléctrica
* Cápsulas de desecación
* Balanza analítica
* DesecadorBaño de agua caliente

El contenido en humedad de las muestras se analizó mediante el método gravimétrico en estufa hasta peso constante, de acuerdo con la norma ISO R-1442. La humedad se determinó pesando 5 g de muestra en cápsulas previamente desecadas con arena y se añadió etanol. Primero, se pre-secaron en un baño de agua caliente para que se evaporará el alcohol y a continuación, se introdujeron en la estufa a 100 ºC durante 24 horas y se mantuvieron durante 3 horas en el desecador antes de proceder a su pesada.

### Análisis de aminas Biógenas

* HPLC con detección por UV.

Se basa en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con detección por UV. En primer lugar, se realizó una extracción de las aminas de la muestra con ácido tricloroacético y la derivatización del extracto empleando una disolución de ortoftaldehído (OPA). Finalmente se analizaron en el cromatógrafo con el objetivo de identificar cada una de las aminas presentes en la muestra y cuantificarlas empleando disoluciones patrón. Se utilizó un método cuantitativo basado en la AOAC official method 954.04 y en la AOAC official method 977.13 para determinar histamina en pescado. Los resultados se expresaron en mg/kg con respecto al total de muestra.

### Análisis de Minerales

* ICP (Espectrómetro de plasma inducido)
* Calcio, fósforo, cobre, hiero, zinc, manganeso, yodo y selenio

Se digieren la muestra con ácidos y se analiza por ICP. Los resultados se expresan en mg/kg con respecto al total de muestra.

### Metales pesados

* ICP (Espectrómetro de plasma inducido)
* Plomo, mercurio, cadmio y arsénico

El método de metales se basa en la norma UNE-EN ISO 16968:2015. Se digieren la muestra con ácidos y se analiza por ICP.

### Acidez

* Erlenmeyer
* Bureta

La acidez se analiza mediante volumetría. El aceite se disolvió en una mezcla de alcohol-éter etílico, se añadió fenoftaleína y se valoró con NaOH 0,1 N hasta viraje del indicador.

### Índice de peróxidos

* Erlenmeyer
* Bureta

El índice de peróxidos se analiza mediante valoración con sodio tiosulfato 0,01 N y almidón como indicador, tras disolución con diclorometano, ácido acético y yoduro potásico.

## **2.2. Acción 2.2. Selección de los ingredientes y requerimientos de corvina y trucha**

La selección de los ingredientes factibles de ser usados en la formulación de pienso para peces ha sido sujeta a un proceso predeterminado siguiendo las orientaciones de la industria de pienso para acuicultura. Este proceso depende de la calidad nutricional del ingrediente y su adecuación a las necesidades de la especie diana.

A raíz de la realización de un análisis detallado de la composición proximal en la actividad A.2.1, se ha fijado en esta tarea un estudio comparativo de los datos obtenidos respecto a los ingredientes tradicionales usados por la industria de fabricación de pienso. El análisis se basó sobre todo en la composición total en proteínas y lípidos además del perfil de aminoácidos y ácidos grasos respectivamente.

En una segunda fase se realizó un análisis del estado de integridad de las muestras mediante el análisis de las aminas biógenas. A continuación, se valoraron los límites permitidos para su incorporación a la dieta.

Finalmente se realizó un estudio bibliográfico para identificar los requerimientos nutricionales de la trucha arco iris y la corvina en las etapas específicas de su cultivo haciendo un hincapié en la fase de preengorde o juveniles la cual va a ser el objetivo de nuestra formulación.

# **4. RESULTADOS OBTENIDOS**

## **4.1. Acción 2.1. Análisis de la composición de los productos**



### Microalgas

***Análisis individual***

Se realizó un análisis preliminar de la composición proximal de las microalgas de una manera individual para saber la idoneidad de cada una de ellas. Los datos respecto a peso seco mostraron una baja concentración de lípidos en el caso de la *R. lens* cuando las tres otras especies tenía un valor superior similares a las observados en la fase de laboratorio y superiores al 6 % algo similar a una harina de pescado. Las 4 microalgas tenían un nivel alto en proteínas oscilando entre 22 y 40 % de la materia seca y aproximadamente unos 20 % de ceniza, un valor alto respecto a lo normal y puede ser debido al proceso de centrifugación que tiene que ser optimizado.

Tabla 1. Datos del análisis proximal de las 4 microalgas en base seca.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Parámetro** g/100g | *I. galbana* | *N. gaditana* | *T. lutea* | *R. lens* |
| Grasa bruta | 11,57 | 8,05 | 6,86 | 2,80 |
| Proteína | 26,17 | 22,80 | 23,51 | 41,82 |
| Cenizas | 19,52 | 19,87 | 20,04 | 18,40 |
| Carbohidratos | 42,75 | 49,29 | 49,59 | 36,99 |
| Humedad | 14,81 | 10,38 | 11,36 | 8,23 |

En cuanto al perfil de ácidos grasos, se observaron diferencias entre las cuatro especies. *T. lutea* y *R. lens* tienen el nivel más bajo de ácidos grasosmonoinsaturados (19 y 21% respectivamente), cuanto las dos otras especies tienen valores superiores al 30%. Sin embargo, las mismas especies presentan los valores de ácidos grasos poliinsaturados más altos con más de 40% del total. Respecto a los ácidos grasos saturados, *I. galbana* es la especie que contiene mayor porcentaje, seguida por *R. lens*.

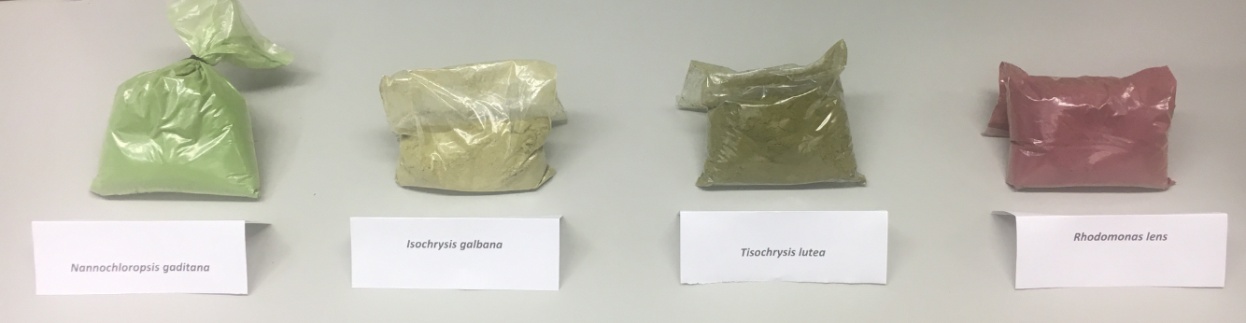


Figura 1.Microalgas.

Como era previsible, *N. gaditana* tiene el mayor porcentaje de EPA (19 %) e *I. galbana* de DHA (4,13%). *R. lens* tiene los valores más bajos de ambos ácidos grasos, sin embargo, es la especie que su perfil contiene más ácido linolénico representando el 40% de su composición.

Cabe resaltar que la biomasa de *T. lutea* seca por spray-dry contiene más del 50% de los ácidos grasos forma de omega 3, seguida por*R. lens*. El nivel más bajo se observa en *N. gaditana* (9,6%) que al contrario tiene el valor de la omega 6 más alto. Los datos del perfil de ácidos grasos son complementarios y justifican la combinación de las 4 especies para la formulación del pienso (Tabla 2).

Tabla 2. Perfil completo de ácidos grasos en los cuartos productos finales de microalgas.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Parámetro (% en grasa)** | **Isochrysis galbana** | **Nannochloropsis gaditana** | **Tisochrysis lutea** | **Rhodomonas lens** |
| Ác. butírico (C:4:0) | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,11 |
| Ác. Caproico (C:6:0) | 0,11 | 0,00 | 0,11 | 0,11 |
| Ác. Caprílico (C:8:0) | 0,11 | 0,33 | 0,11 | 0,11 |
| Ác. Cáprico (C:10:0) | 0,11 | 0,33 | 0,11 | 0,00 |
| Ác. Undecanoico (C:11:0) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,11 |
| Ác. Laúrico (C:12:0) | 0,23 | 0,33 | 0,11 | 0,22 |
| Ác. Tridecanoico (C:13:0) | 0,11 | 0,00 | 0,11 | 0,32 |
| Ác. Mirístico (C:14:0) | 15,73 | 4,75 | 16,82 | 6,17 |
| Ác. Miristoleico (C:14:1) | 0,11 | 0,11 | 0,56 | 0,32 |
| Ác. Pentadecanoico (C:15:0) | 0,34 | 0,33 | 0,45 | 0,32 |
| Ác. Pentadecenoico (C:15:1) | 0,00 |  | 0,33 | 0,00 |
| Ác. Palmítico (C:16:0) | 26,18 | 27,15 | 13,36 | 25,76 |
| Ác. Palmitoleico (C:16:1) con isómeros | 8,61 | 27,59 | 5,46 | 3,14 |
| Ác. Margárico (C:17:0) | 0,46 | 0,33 | 0,22 | 0,32 |
| Ác. Margaroleico (C:17:1) | 0,23 | 0,77 | 0,45 | 0,11 |
| Ác. Esteárico (C:18:0) | 0,23 | 0,88 | 2,56 | 4,00 |
| Ác. Oleico (C:18:1) con isómeros | 22,04 | 6,07 | 12,58 | 18,18 |
| Ác. Linoleico (C:18:2) con isómeros | 4,71 | 6,51 | 2,78 | 1,19 |
| Ác. Gamma-linolénico (C:18:3n6) | 0,11 | 0,66 | 0,11 | 0,00 |
| Ác. Linolénico (ALA) (C:18:3n3) | 21,70 | 9,38 | 43,54 | 40,48 |
| Ác. Estearidónico (C:18:4n3) | 3,90 | 0,11 | 7,35 | 3,57 |
| Ác. Aráquico (C:20:0) | 0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,87 |
| Ác. Gadoleico (C:20:1) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,11 |
| Ác. Eicosadienoico (C:20:2n6) | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Dihomo-gamma-linolénico (C:20:3n6) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Eicosatrienoico (C:20:3n3) | 0,00 | 0,11 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Araquidónico (C:20:4n6) | 0,57 | 4,08 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Eicosatetranoico (C:20:4n3) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,22 |
| Ác. Eicosapentaenoico(C:20:5) (EPA) | 2,30 | 19,43 | 1,00 | 1,62 |
| Ác. Heneicosanoico (C:21:0) | 0,00 | 0,22 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Behénico (C:22:0) | 0,23 | 0,55 | 0,45 | 0,11 |
| Ác. Erúcico (C:22:1n9) | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,00 |
| Ác. Docosadienoico (C:22:2) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Docosapentaenoico (C:22:5n3) (DPA) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,11 |
| Ác. Cervónico (C:22:6) (DHA) | 4,13 | 0,00 | 2,34 | 0,65 |
| Ác. Tricosanoico (C:23:0) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Lignocérico (C:24:0) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ác. Nervónico (C:24:1) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

El perfil de aminoácidos ha sido similar en todas las microalgas analizadas con un alto nivel de arginina, ácido aspártico y ácido glutámico. La única diferencia remarcable es el alto nivel de la leucina en *T. lutea* respecto al resto de las especies. La lisina y la metionina están a nivel interesante en las 4 especies.

Tabla 3. Aminograma de las diferentes Microalgas

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Aminograma** | I. galbana | N. gaditana | T.lutea | R. lens |
| Ác. aspártico | 16% | 12% | 12% | 16% |
| Ác. glutámico | 18% | 17% | 15% | 16% |
| Serina | 6% | 6% | 6% | 7% |
| Histidina | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Glicina | 5% | 5% | 4% | 5% |
| Treonina | 6% | 4% | 4% | 4% |
| Arginina | 20% | 18% | 19% | 21% |
| Alanina | 1% | 2% | 1% | 2% |
| Tirosina | 2% | 3% | 4% | 3% |
| Cistina | 3% | 1% | 1% | 2% |
| Valina | 1% | 0% | 1% | 1% |
| Metionina | 4% | 5% | 4% | 5% |
| Fenilalanina | 5% | 4% | 3% | 3% |
| Isoleucina | 7% | 8% | 5% | 5% |
| Leucina | 1% | 7% | 13% | 1% |
| Lisina | 5% | 8% | 6% | 8% |
| Prolina | 1% | 0% | 0% | 0% |

***Análisis del combinado.***

La combinación de las 4 microalgas ha dado lugar a un producto con un 9% de grasa y 25,8% de proteína. El perfil de ácidos grasos se compone mayoritariamente de poliinsaturados representando más del 42% de la grasa total cuando los monoinsaturados y saturados representan el 28% cada uno.

El producto combinado de las 4 especies obtenido tiene un 34% de EPA y 0.11% de DHA teniendo una ratio bastante bajo en EPA/DHA. El valor del DHA es bastante bajo y tiene que ser compensado dentro de la dieta final.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos del mix de microalgas

|  |  |
| --- | --- |
| **Ácidos grasos % (m.s)** | **Resultados** |
| Ác. Butírico (C:4:0) | <0,1 |
| Ác. Caproico (C:6:0) | <0,1 |
| Ác. Caprílico (C:8:0) | 0,32 |
| Ác. Cáprico (C:10:0) | 0,22 |
| Ác. Undecanoico (C:11:0) | <0,1 |
| Ác. Láurico (C:12:0) | 0,43 |
| Ác. Tridecanoico (C:13:0) | 0,11 |
| Ác. Mirístico (C:14:0) | 5,41 |
| Ác. Miristoleico (C:14:1) | 0,22 |
| Ác. Pentadecanoico (C:15:0) | 0,43 |
| Ác. Pentadecenoico (C:15:1) | <0,1 |
| Ác. Palmítico (C:16:0) | 20,78 |
| Ác. Palmitoleico (C:16:1) con isómeros | 27,60 |
| Ác. Margárico (C:17:0) | <0,1 |
| Ác. Margaroleico (C:17:1) | 0,11 |
| Ác. Esteárico (C:18:0) | 0,32 |
| Ác. Oleico (C:18:1) con isómeros | 3,57 |
| Ác. Linoleico (C:18:2) con isómeros | 2,16 |
| Ác. gamma-Linolénico (C:18:3n6) | 0,65 |
| Ác.Linolénico (ALA) (C:18:3n3) | 6,60 |
| Ác. Estearidónico (C:18:4n3) | 0,22 |
| Ác. Aráquico (C:20:0) | 0,32 |
| Ác. Gadoleico (C:20:1) | 0,11 |
| Ác.Eicosadienoico (C:20:2n6) | 0,22 |
| Ác Dihomo-gamma-linolénico (C:20:3n6) | 0,32 |
| Ác. Eicosat rienoico (C:20:3n3) | 0,11 |
| Ác. Araquidónico (C:20:4n6) | 0,22 |
| Ác. Eicosatetraenoico (C:20:4n3) | 0,22 |
| Ác. Eicosapentaenoico(C:20:5) (EPA) | 34,96 |
| Ác. Heneicosanoico (C:21:0) | 0,11 |
| Ác. Behénico (C:22:0) | 1,95 |
| Ác. Erúcico (C:22:1n9) | 0,32 |
| Ác. Docosadienoico (C:22:2) | 0,11 |
| Ác. Docosapentaenoico (C:22:5n3) (DPA) | <0,1 |
| Ác. Cervónico (C:22:6) (DHA) | 0,11 |
| Ác. Tricosanoico (C:23:0) | 0,22 |
| Ác. Lignocérico (C:24:0) | 0,22 |
| Ác. Nervónico (C:24:1) | <0,1 |
| Ác. Cis-oleico (C:18:1n9c) | 2,92 |
| Ác Trans-oleico (C:18:1t) | 0,22 |
| Ác. Vacénico (C18:1n7c) | 0,43 |
| Ác. Cis-Linoleico (C:18:2n6c) (LA) | 2,16 |
| Ác Linolelaídico (C18:2t)(translinoleico) | <0,1 |
| Ác. transLinolénico (C:18:3t) | <0,1 |
| Ac. grasos trans-oleicos | 0,02 |
| Ác. gra translinoleico+translinolénico | <0,02 |
| Ácidos grasos Omega 3 | 3,46 |
| Ác.Linolénico (ALA)(C:18:3n3c) | 0,54 |
| Ác. Estearidónico (C:18:4n3) | <0,1 |
| Ác. Eicosatetraenoico (C:20:4n3) | <0,1 |
| Ác. Eicosapentaenoico (C:20:5) (EPA) | 2,92 |
| Ác. docosapentaenoico (C:22:5n3) (DPA) | <0,1 |
| Ác. Cervónico (C:22:6) (DHA) | <0,1 |
| Ácidos grasos Omega 6 | <0,5 |
| Ác. Linoleico (C:18:2n6c) (LA) | <0,5 |
| Ác. gamma-Linolénico (C:18:3n6) | 0,11 |
| Ác. Eicosadienoico (C:20:2n6) | <0,1 |
| Ác. cis-8,11,14-eicosatrienoico (C:20:3n6) | <0,1 |
| Ác. Araquidónico (C:20:4n6) | <0,1 |
| Ácidos grasos monoinsaturados | 2,71 |
| Ácidos grasos poliinsaturados | 3,90 |
| Ácidos grasos saturados | 2,60 |

\*m.s.: materia seca

El conjunto de microalgas destaca por la presencia de lisina, arginina y ácido glutámico en el aminograma (Tabla 5). La lisina y la arginina son dos de los aminoácidos esenciales de interés en la dieta de los peces y su deficiencia supone problemas de crecimiento entre otros. Aunque se destaca también, el nivel bajo de metionina.

Tabla 5. Aminograma del mix de las microalgas

|  |  |
| --- | --- |
| **Aminograma** | **Resultado (% m.s.\*)** |
| Ác. aspartico | 1,71 |
| Ác. glutámico | 2,38 |
| Serina | 0,76 |
| Histidina | 0,15 |
| Glicina | 0,92 |
| Treonina | 0,70 |
| Arginina | 2,44 |
| Alanina | 0,18 |
| Tirosina | 0,09 |
| Cistina | 0,08 |
| Valina | 0,36 |
| Metionina | 0,48 |
| Fenilalanina | 0,27 |
| Isoleucina | 0,37 |
| Leucina | 1,27 |
| Lisina | 3,01 |
| Prolina | 0,90 |

A excepción de la putrescina, no se detectaron aminas biógenas en las microalgas (Tabla 6), pero este compuesto se presenta en una cantidad baja, lo que no supone ningún problema para la fabricación del pienso.

Tabla 6. Análisis de las aminas biógenas del mix de microalgas

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Aminas biógenas** | **Resultados** | **Unidades (m.s.\*)** |
| Histamina | <10 | (LC 10mg/kg) |
| Cadaverina | <10 | (LC 5mg/kg) |
| Putrescina | 44,81 | (LC 5mg/kg) |
| Tiramina | <10 | (LC 5mg/kg) |

En la Tabla 7, se detalla el contenido en algunos minerales de este producto, destacando la presencia de calcio y hierro.

Tabla 7. Análisis de la composición mineral del mix de microalgas

|  |  |
| --- | --- |
| **Minerales (mg/kg m.s.\*)** | **Resultados** |
| Arsénico | 1,24 |
| Cadmio | 0,08 |
| Hierro | 341,40 |
| Cobre | 22,02 |
| Mercurio | n.d. |
| Selenio | 0,21 |
| Plomo | n.d. |
| Zinc | 41,29 |
| Fósforo | 195,65 |
| Calcio | 3816,63 |
| Manganeso | 117,67 |
| Yodo | 2,92 |

\*m.s.: materia seca

### Agua de cocción

* **Fracción lipídica**:

Los resultados de acidez y de índice de peróxidos indican buena calidad del aceite, pues presenta unos valores bajos (1,2% expresado en ácido oleico y 44,2 meq O2/Kg aceite). Por otro lado, entre los resultados del perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica, destacan los valores de EPA y DHA, que son los ácidos grasos más importantes para el desarrollo de los peces criados en acuicultura, suponiendo en conjunto casi un 34% del total de los ácidos grasos.

****Figura 2. Fracción lipídica

La composición de ácidos grasos del aceite obtenido en este proyecto es similar al aceite de pescado comúnmente utilizado en acuicultura. El aceite de pescado presenta un contenido un poco mayor en ácido oleico, linoleico, EPA y DPA que el aceite recuperado del agua de cocción del atún, y este último presenta mayor porcentaje de DHA, poliinsaturados, omega 3 y omega 6. De modo que, el aceite obtenido parece ser un componente adecuado para su utilización en pienso acuícolas por los altos contenidos en EPA y DHA que se han conseguido en la actividad A.1.

Los resultados de acidez e índice de peróxidos de la fracción lipídica (Figura 2) se detallan en la Tabla 8. En la Tabla 9 se muestran los resultados de la composición de ácidos grasos de la fracción lipídica.

Tabla 8. Parámetros de calidad de la fracción lipídica.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Parámetro** | Fracción lipídica | Unidades |
| Acidez | 1,2 | % ácido oleico |
| Índice de Peróxidos | 44,2 | meq O2/ kg de aceite |

Tabla 9. Composición de la fracción lipídica.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ácidos grasos (% del total de a.g.)** | Fracción lipídica | Aceite de pescado 1 |
| C14:0 (Mirístico) | 3,86 | 3,9 |
| C15:0 | 0,99 | - |
| C16:0 (Palmítico) | 17,98 | 17,7 |
| C16:1(n-7+n-9) | 4,44 | - |
| C17:0 (Margárico) | 0,98 | - |
| C17:1 (Margaroleico) | 0,92 | - |
| C18:0 (Esteárico) | 4,62 | 4,9 |
| C18:1T (Oléico-trans) | 0,14 | - |
| C18:1n-9 (Oleico) | 11,96 | 14,8 |
| C18:1n-7 (Vaccénico) | 2,43 | 2,6 |
| C18:2T (Linoléico-trans) | 0,45 | - |
| C18:2n-6 (Linoléico ) | 1,44 | 2,0 |
| C18:3n-6 (Gamma) | 0,69 | - |
| C20:0 (Araquídico) | 0,1 | - |
| C18:3n-3 (Linolénico-ALA) | 0,62 | 0,6 |
| C20:1 | 1,4 | - |
| C18:4n-3 (Moróctico) | 0,21 | - |
| C21:0 | 1,14 | - |
| C20:2 | 0,29 | - |
| C20:3n-6 | 0,27 | - |
| C20:3n-3 | 0,21 | - |
| C20:4n-6 (ARA) | 2,12 | - |
| C23:0 | 0,6 | - |
| C20:5n-3 (EPA) | 7,38 | 8,5 |
| C24:0 (Lignocérico) | 0,12 | - |
| C22:4n-6 (DTA) | 1,36 | - |
| C22:5n-3 (DPA) | 1,34 | 1,7 |
| C22:6n-3 (DHA) | 26,45 | 19,1 |
| Saturados | 30,39 | - |
| Monoinsaturados | 21,15 | - |
| Poliinsaturados | 42,09 | 37,6 |
| EPA + DHA | 33,83 | 27,6 |
| Omega - 3 | 36,21 | 32,0 |
| Omega - 6 | 5,88 | 4,5 |
| Trans | 0,59 | - |

1Campos et al., 2019.

* **Fracción Proteica**:

Esta fracción es recuperada del agua de cocción de conservas de atún (Figura 2). Los resultados de los análisis de este producto se detallan en las Tablas 10, 11, 12, 13 y 14. Este ingrediente contiene, como era de esperar, un alto porcentaje de proteínas, llegando casi al 73% del total. Además, presenta también un alto contenido de cenizas, alrededor de un 27%, y muy poco contenido en grasa. La fracción proteica obtenida tiene una composición similar a la comercial (Wei et al., 2019) en lo referente a las proteínas y las cenizas. El alto contenido en proteínas de este ingrediente alternativo lo convierte en un componente del pienso adecuado para la nutrición de peces de acuicultura, que requieren aproximadamente un 40-50% de este macronutriente en la composición final (Estévez et al., 2011; FAO).

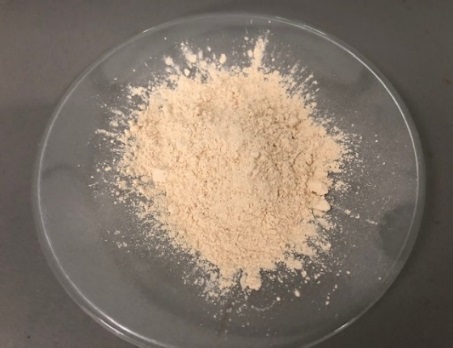


Figura 3. Fracción proteica obtenida.

Tabla 10. Composición proximal de la fracción proteica.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Composición proximal** | Fracción proteica (%\*m.s.) | Harina de pescado1 |
| Humedad | 6,2 | - |
| Grasa | <0,5 | 8,10 |
| Proteína (N\*6,25) | 77,51 | 71,09 |
| Cenizas | 28,46 | 20,0 |

\*m.s.: materia seca; 1Wei et al., 2019.

En cuanto al aminograma, los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción en la fracción proteica son la glicina, la alanina y el ácido glutámico. Aunque presenta un porcentaje menor de aminoácidos que la harina de pescado comercial, se observa que coincide el mayor porcentaje en los mismos aminoácidos para ambas harinas (Wei et al. 2019).

Tabla 11. Resultados análisis fracción proteica.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Aminograma** | Fracción proteica (% m.s.\*) | Harina de pescado1 |
| Ác. aspártico | 1,35 | 5,24 |
| Ác. glutámico | 2,84 | 8,34 |
| Serina | 1,14 | 2,80 |
| Histidina | 1,62 | 1,15 |
| Glicina | 3,45 | 4,04 |
| Treonina | 0,53 | 2,51 |
| Arginina | 0,13 | 3,61 |
| Alanina | 3,06 | 3,35 |
| Tirosina | 0,61 | 1,88 |
| Cisteina | 0,02 | 0,50 |
| Valina | 0,75 | 2,60 |
| Metionina | 0,54 | 1,76 |
| Fenilalanina | 0,42 | 2,20 |
| Isoleucina | 0,95 | 2,34 |
| Leucina | 0,23 | 4,24 |
| Lisina | 1,59 | 3,59 |
| Prolina | 1,35 | 2,25 |

\*m.s.: materia seca; 1Wei et al., 2019.

El perfil de ácidos grasos no aporta más información sobre el producto obtenido, ya que la cantidad de grasa es muy baja.

Tabla 12. Perfil de ácidos grasos de la fracción proteica.

|  |  |
| --- | --- |
| **Ácidos grasos** | Fracción proteica (g/100g \*m.s.) |
| A. g. monoinsaturados | <0,1 |
| A.g. poliinsaturados | <0,1 |
| A.g. saturados | <0,1 |
| A. g. transolicos | <0,02 |
| A. g. translinoleico-translinolenico | <0,02 |
| A. g. omega 3 | <0,6 |
| Ác. Linolénico (ALA) | <0,1 |
| Ác. Esteanidónico | <0,1 |
| Ác. Eicosatetraenoico | <0,1 |
| Ác. Eicosapentanoico (EPA) | <0,1 |
| Ác. Docosapentanoico (DPA) | <0,1 |
| Ác. Cervónico (DHA) | <0,1 |
| A. g. omega 6 | <0,5 |
| Ác. Linoleico (LA) | <0,1 |
| Ác. gamma-linolénico | <0,1 |
| Ác. eicosadienoico | <0,1 |
| Ác. cis-8,11,14-eicosatrienoico | <0,1 |
| Ác. araquidónico | <0,1 |

\*m.s.: materia seca

Las aminas biógenas detectadas en estos ingredientes son relativamente altas. Estos compuestos han demostrado en diferentes estudios afectar al crecimiento de los peces, debido a la disminución de la disponibilidad de aminoácidos a la que da lugar (Jasour et al., 2018; Opstvedt et al., 2000; Tapia-Salazar et al., 2004).

Tabla 13. Contenido en aminas biógenas de la fracción proteica.

|  |  |
| --- | --- |
| **Aminas biógenas** | Fracción proteica (mg/kg \*m.s.) |
| Histamina | 35,93 |
| Cadaverina | 987,95 |
| Putrescina | 702,13 |
| Tiramina | 643,71 |

\*m.s.: materia seca

Entre los minerales analizados, cabe destacar la presencia de fósforo, esencial para el desarrollo del esqueleto de los peces, y calcio.

Tabla 14. Contenido en minerales de la fracción proteica.

|  |  |
| --- | --- |
| **Minerales** | Fracción proteica (mg/kg m.s.\*) |
| Arsénico | 5,75 |
| Cadmio | 1,27 |
| Hierro | n.d |
| Cobre | 58,14 |
| Mercurio | n.d |
| Selenio | 15,08 |
| Plomo | n.d |
| Zinc | 59,53 |
| Fósforo | 899,47 |
| Calcio | 93,70 |
| Manganeso | 1,03 |
| Yodo | 0,43 |

\*m.s.: materia seca

### Harina de insectos

Se analizó la harina de las dos especies de insectos producidas. Se ha observado una diferencia en cuanto a composición de cada una de las dos. La *A. domesticus* mostro más nivel de grasa y de proteína respecto a la *H. illucens* (Tabla 15). La misma tendencia se observa también en el perfil de aminoácidos a la excepción del caso de la arginina y la leucina (tabla 16).

Tabla 15. Composición proximal de las dos especies de insectos

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Composición proximal (% m.s. \*)** | ***Acheta domesticus*** | ***Hermetia illucens*** |
| Humedad | 6,4 | 7,3 |
| Grasa | 24,4 | 18,57 |
| Proteína (N\*6,25) | 62,2 | 43,80 |
| Cenizas | 5,6 | 9,94 |

\*m.s.: materia seca

Tabla 16. Aminograma de las dos especies de insectos producidas

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Aminograma (% m.s.\*)** | ***Acheta domesticus*** | ***Hermetia illucens*** |
| Ác. aspartico | 2,75 | 2,24 |
| Ác. glutámico | 4,44 | 3,20 |
| Serina | 2,07 | 1,06 |
| Histidina | 0,67 | 0,30 |
| Glicina | 1,29 | 1,16 |
| Treonina | 1,73 | 1,23 |
| Arginina | 1,47 | 3,84 |
| Alanina | 4,51 | 0,42 |
| Tirosina | 5,20 | 0,68 |
| Cistina | 0,10 | 0,01 |
| Valina | 1,56 | 0,82 |
| Metionina | 1,04 | 0,21 |
| Fenilalanina | 0,95 | 0,72 |
| Isoleucina | 2,41 | 1,85 |
| Leucina | 0,12 | 0,21 |
| Lisina | 2,53 | 4,65 |
| Prolina | <0,10 | <0,10 |

\*m.s.: materia seca

Respecto al perfil de ácidos grasos la harina de *H. illucens* mostró unos valores superiores en cuanto a EPA y DHA cunado la Acheta mostro un perfil de ácidos grasos bastante más abundante en mono y poliinsaturados. Hay que resaltar que el perfil de ácidos grasos de *H. illucens* presenta un valor muy alto de ácido láurico al contrario que *A. domesticus*, que contiene más ácido oleico y ácido linoleico.

Tabla 17. Perfil de ácidos grasos de la harina de las dos especies de insectos producidas.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ácidos grasos** | ***Acheta domesticus*** | ***Hermetia illucens*** | **Unidades (m.s.\*)** |
| Ác. Butírico (C:4:0) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Caproico (C:6:0) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Caprílico (C:8:0) | <0,1 | 0,97 | % relativo |
| Ác. Cáprico (C:10:0) | <0,1 | 2,38 | % relativo |
| Ác. Undecanoico (C:11:0) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Láurico (C:12:0) | <0,1 | 49,57 | % relativo |
| Ác. Tridecanoico (C:13:0) | <0,1 | 0,11 | % relativo |
| Ác. Mirístico (C:14:0) | 0,64 | 8,86 | % relativo |
| Ác. Miristoleico (C:14:1) | <0,1 | 0,43 | % relativo |
| Ác. Pentadecanoico (C:15:0) | 0,11 | 0,22 | % relativo |
| Ác. Pentadecenoico (C:15:1) | 0,11 | 0,22 | % relativo |
| Ác. Palmítico (C:16:0) | 27,88 | 10,80 | % relativo |
| Ác. Palmitoleico (C:16:1) con isómeros | 0,96 | 3,78 | % relativo |
| Ác. Margárico (C:17:0) | 0,21 | 0,22 | % relativo |
| Ác. Margaroleico (C:17:1) | 0,11 | 0,32 | % relativo |
| Ác. Esteárico (C:18:0) | 8,55 | 1,62 | % relativo |
| Ác. Oleico (C:18:1) con isómeros | 28,53 | 10,80 | % relativo |
| Ác. Linoleico (C:18:2) con isómeros | 38,35 | 10,91 | % relativo |
| Ác. gamma-Linolénico (C:18:3n6) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác.Linolénico (ALA) (C:18:3n3) | 1,18 | 1,08 | % relativo |
| Ác. Estearidónico (C:18:4n3) | <0,1 | 1,08 | % relativo |
| Ác. Aráquico (C:20:0) | 0,21 | 0,11 | % relativo |
| Ác. Gadoleico (C:20:1) | 0,11 | 0,22 | % relativo |
| Ác.Eicosadienoico (C:20:2n6) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác Dihomo-gamma-linolénico (C:20:3n6) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Eicosatrienoico (C:20:3n3) | <0,1 | 0,65 | % relativo |
| Ác. Araquidónico (C:20:4n6) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Eicosatetraenoico (C:20:4n3) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Eicosapentaenoico(C:20:5) (EPA) | <0,1 | 1,51 | % relativo |
| Ác. Heneicosanoico (C:21:0) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Behénico (C:22:0) | <0,1 | 1,19 | % relativo |
| Ác. Erúcico (C:22:1n9) | <0,1 | 0,11 | % relativo |
| Ác. Docosadienoico (C:22:2) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Docosapentaenoico (C:22:5n3) (DPA) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Cervónico (C:22:6) (DHA) | <0,1 | 0,54 | % relativo |
| Ác. Tricosanoico (C:23:0) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ác. Lignocérico (C:24:0) | <0,1 | 0,32 | % relativo |
| Ác. Nervónico (C:24:1) | <0,1 | 0,22 | % relativo |
| Ác. Cis-oleico (C:18:1n9c) | 27,67 | 10,15 | % relativo |
| Ác Trans-oleico (C:18:1t) | 0,32 | 0,22 | % relativo |
| Ác. Vacénico (C18:1n7c) | 0,53 | 0,43 | % relativo |
| Ác. Cis-Linoleico (C:18:2n6c) (LA) | 37,93 | 10,91 | % relativo |
| Ác Linolelaídico (C18:2t)(translinoleico) | 0,43 | <0,1 | % relativo |
| Ác. transLinolénico (C:18:3t) | <0,1 | <0,1 | % relativo |
| Ac. grasos trans-oleicos | 0,07 | 0,03 | g/100 g |
| Ác. gra translinoleico+translinolénico | 0,10 | <0,02 | g/100 g |
| Ácidos grasos Omega 3 | <0,1 | 0,76 | g/100 g |
| Ác.Linolénico (ALA) (C:18:3n3c) | 0,32 | 0,22 | g/100 g |
| Ác. Estearidónico (C:18:4n3) | <0,1 | 0,22 | g/100 g |
| Ác. Eicosatetraenoico (C:20:4n3) | <0,1 | <0,1 | g/100 g |
| Ác. Eicosapentaenoico (C:20:5) (EPA) | <0,1 | 0,22 | g/100 g |
| Ác. docosapentaenoico (C:22:5n3) (DPA) | <0,1 | <0,1 | g/100 g |
| Ác. Cervónico (C:22:6) (DHA) | <0,1 | 0,11 | g/100 g |
| Ácidos grasos Omega 6 | 8,65 | 1,84 | g/100 g |
| Ác. Linoleico (C:18:2n6c) (LA) | 8,65 | 1,84 | g/100 g |
| Ác. gamma-Linolénico (C:18:3n6) | <0,1 | <0,1 | g/100 g |
| Ác. Eicosadienoico (C:20:2n6) | <0,1 | <0,1 | g/100 g |
| Ác. cis-8,11,14-eicosatrienoico (C:20:3n6) | <0,1 | <0,1 | g/100 g |
| Ác. Araquidónico (C:20:4n6) | <0,1 | <0,1 | g/100 g |
| Ácidos grasos monoinsaturados | 6,73 | 2,70 | g/100 g |
| Ácidos grasos poliinsaturados | 8,97 | 2,70 | g/100 g |
| Ácidos grasos saturados | 8,55 | 13,17 | g/100 g |

\*m.s.: materia seca

La composición mineral de las dos especies es también diferente. Destaca *H. illucens* por un nivel alto de hierro, selenio, fosforo y calcio mientras que *A. domesticus* contiene más yodo, magnesio, zinc y cobre.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Minerales (mg/kg m.s.\*)** | ***Acheta domesticus*** | ***Hermetia illucens*** |
| Arsénico | n.d. | 0,91 |
| Cadmio | 0,067 | 0,11 |
| Hierro | n.d. | 190,20 |
| Cobre | 59,179 | 26,14 |
| Mercurio | n.d. | n.d. |
| Selenio | 0,906 | 2,10 |
| Plomo | n.d. | n.d. |
| Zinc | 122,988 | 66,82 |
| Fósforo | 587,194 | 674,81 |
| Calcio | 136,270 | 2675,87 |
| Manganeso | 48,710 | 24,37 |
| Yodo | 7,26 | <0,20 |

\*m.s.: materia seca

El análisis de las aminas biógenas mostro un alto nivel de histamina, cadaverina, putrescina y tiramina en la muestra de harina de *H. illucens*. Estos datos son excluyentes a la hora de su uso en la formulación de dietas para peces.

Tabla 18. Presencia de aminas biógenas en las dos harinas de insectos.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aminas biógenas (mg/kg m.s.\*)** | ***Acheta domesticus*** | ***Hermetia illucens*** | **Unidades** |
| Histamina | <10 | 2047,4 | (LC 10mg/kg) |
| Cadaverina | <10 | 46657,4 | (LC 5mg/kg) |
| Putrescina | <10 | 2867,4 | (LC 5mg/kg) |
| Tiramina | <10 | 16817,4 | (LC 5mg/kg) |

\*m.s.: materia seca

El contenido en grasa de *A. domesticus* analizado en este estudio es mayor y las proteínas y cenizas similares (Tabla 19) a otros estudios (Ribeiro et al, 2019). Los resultados obtenidos para este insecto coinciden con el informe enviado por la empresa productora.

Tabla 19.**C**omposición de la harina de A. domesticus.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Composición proximal (% m.s. \*)** | *A. domesticus* | *A. domesticus 1* | *A. domesticus 2* | *A. domesticus 3* | Informe |
| Grasa | 24,4 | 12,16 | 23,7 | 17,4 | 25,5 |
| Proteína | 62,2 | 65,85 | 64,4 | 57,8 | 64 |
| Cenizas | 5,6 | 4,81 | 4,9 | - | - |

\*m.s.: materia seca; 1Kamau et al., 2018; 2Ribeiro et al., 2019; 3Oonincx et al., 2015.

El perfil de ácidos grasos del grillo (Tabla 20) es similar al descrito por otros estudios (Oonincx et al., 2015) con un alto nivel de ácido palmitoleico, Ácido oleico y ácido linoleico, y bajos niveles de DHA y EPA.

Tabla 20.Perfil de ácidos grasos de la harina de A. domesticus.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ácidos grasos (% relativo)** | *A. domesticus* | *A. domesticus3* |
| Ác. Láurico (C:12:0) | <0,1 | 0,1 |
| Ác. Tridecanoico (C:13:0) | <0,1 | 3,5 |
| Ác. Mirístico (C:14:0) | 0,64 | 0,7 |
| Ác. Palmítico (C:16:0) | 27,88 | 25,1 |
| Ác. Palmitoleico (C:16:1) con isómeros | 0,96 | 0,8 |
| Ác. Margárico (C:17:0) | 0,21 | 0,3 |
| Ác. Esteárico (C:18:0) | 8,55 | 7,9 |
| Ác. Oleico (C:18:1) con isómeros | 28,53 | 23,6 |
| Ác. Linoleico (C:18:2) con isómeros | 38,35 | 34,9 |
| Ác.Linolénico (ALA) (C:18:3n3) | 1,18 | 1,2 |
| Ác. Nervónico (C:24:1) | <0,1 | 0,1 |

\*m.s.: materia seca; 3Oonincx et al., 2015.

El contenido en los minerales hierro y zinc (Tabla 21) de este proyecto es menor al descrito en el informe; mientras que son valores más elevados que los encontrados en otros estudios (Ribeiro et al., 2019).

Tabla 21.Contenido en algunos minerales de la harina de A. domesticus.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Minerales (mg/kg m.s.\*)** | *Acheta domesticus* | *A. domesticus 2* | Informe |
| Arsénico | n.d. | - | - |
| Cadmio | 0,067 | - | - |
| Hierro | n.d. | 7,7 | 229,3 |
| Cobre | 59,179 | 3,4 | - |
| Mercurio | n.d. | - | - |
| Selenio | 0,906 | 0,08 | - |
| Plomo | n.d. | - | - |
| Zinc | 122,988 | 24,4 | 3410 |
| Fósforo | 587,194 | 1806,0 | - |
| Calcio | 136,270 | 103,6 | - |
| Manganeso | 48,710 | 3,7 | - |
| Yodo | 7,26 | - | - |

\*m.s.: materia seca; 2Ribeiro et al., 2019.

Las diferencias encontradas en la composición de las harinas de insectos entre el proyecto y los estudios de bibliografía pueden deberse a la variabilidad en el modo de producción y de alimentación de los grillos.

## **Acción 2.2. Selección de los ingredientes y requerimientos de corvina y trucha**

### Requerimientos de corvina y trucha

En este proyecto se definieron 2 especies de peces en los que estudiar el pienso fabricado, que fueron corvina y trucha.

### Requerimientos nutricionales corvina:

Los requerimientos de proteína para la corvina (*Argyrosomus regius*) se estiman entre un 40 y un 50%, pero se puede conseguir un reemplazo de la harina de pescado por proteínas vegetales hasta alcanzar un 76,2% de la proteína total, sin afectar al crecimiento (Estévez et al., 2011).

Con respecto a los requerimientos de lípidos, han sido establecidos en torno al 17 % (Chatzifotis et al., 2010). Los requerimientos de ácidos grasos esenciales en alevines de corvina se fijaron en un 2,1% de LC-PUFA para conseguir un mayor crecimiento y mayor ratio de conversión de alimento (Carvalho et al., 2018).

Se han utilizado satisfactoriamente pienso para dorada en la cría de corvinas, pero actualmente, existen varias dietas específicas para corvina en el mercado. Se trata de una especie carnívora y el canibalismo puede resultar un problema en los primeros días de vida, lo cual puede solucionarse con una mayor frecuencia de alimentación. Los Índices de Conversión son muy favorables y varían entre 1.7 (FAO) y 0,9-1,2 (Monfort et al., 2010).

La tasa de alimentación para el crecimiento de corvina para juveniles es para una alimentación óptima de 1,5% / día y para mantenimiento de 0,3% / día (Tomas et al., 2008). Los requerimientos nutricionales de la corvina se resumen en la tabla 22.

Tabla 22.Requerimientos nutricionales de proteína y lípidos para la corvina.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nutrientes (% \*m.s.)** | **Corvina1** | **Corvina2** | **Corvina3** | **Corvina4** | **Corvina5** |
| **Proteína cruda (min)** | 50 | 45-48 | 47 | 53 | 50 |
| **Lípidos crudo (min)** | 17 | 20 | 20 | 17 | 16 |

\*m.s.: materia seca; 1Chatzifotis et al., 2010; 2FAO; Martínez-Llorens et al., 2011; Velazco et al., 2014; De Moura et al., 2018.

Una estrategia eficiente para conseguir un crecimiento adecuado de las corvinas es la suplementación en el pienso con 10g/kg de taurina (De Moura et al., 2018). En la tabla 23 se muestra la composición de unos piensos comerciales (Martínez-Llorens et al., 2011; Alvarado et al., 2009) y de otros formulados por los investigadores (Antonopoulou et al., 2014).

Tabla 23.Requerimientos nutricionales para la corvina.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Composición** | **Corvina1** | **Corvina2** | **Corvina3** |
| **Energía (MJ/kg)** | 22,7 | 19,2 | 21,0 |
| **Proteína % min** | 47,0 | 47,0 | 43,0 |
| **Lípidos % min** | 20,0 | 20,0 | 17,0 |
| **Hidratos de carbono** | - | - | 23,5 |
| **Vitamina A (UI)** | - | 5000 | - |
| **Vitamina D3 (UI)** | - | 750 | - |
| **Vitamina E (mg)** | - | 150 | - |

1Martínez-Llorens et al., 2011; 2Alvarado et al., 2009; 3Antonopoulou et al., 2014.

En la tabla 24 se detallan la composición de ácidos grasos de dos piensos comerciales (García et al., 2014).

Tabla 24.Requerimientos nutricionales de ácidos grasos para la corvina.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ácidos grasos (% sobre el total de ácidos grasos)** | **Corvina1** | **Corvina2** |
| **Saturados** | 29,13 | 24,53 |
| **Monoinsaturados** | 29,97 | 27,70 |
| **Poliinsaturados** | 39,03 | 42,47 |
| ***n*-3** | 29,40 | 15,77 |
| ***n*-6** | 9,63 | 26,70 |
| ***n*-3/*n*-6** | 3,05 | 0,59 |

1Estévez et al., 2011; 2Chatzifotis et al., 2010.

### Requerimientos nutricionales trucha:

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) son animales depredadores que subsisten capturando otros seres vivos, por lo que su aparato digestivo está preparado para el aprovechamiento de proteínas animales. En la tabla 25 se muestran los requerimientos nutricionales de la trucha arcoíris.

Tabla 25.Requerimientos nutricionales de energía, proteína y lípidos para la trucha.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nutrientes (\*m.s.)** | **Trucha1** | **Trucha2** | **Trucha3** |
| **Energía (KJ/g)** | 22 | 23,2 | - |
| **Proteína, crudo, % min** | 45,8 | 48,5 | 45-50 |
| **Lípidos, crudo % min** | 20 | 22,7 | - |

\*m.s.: materia seca;  1Ma et al., 2019; 2Rema et al., 2019; 3Orna, 2010.

La trucha puede utilizar pequeñas cantidades de carbohidratos digestibles (glucosa, lactosa, etc), sin superarse el 9% de la ingesta diaria (Orna, 2010). Se suele añadir esta cantidad para aumentar la energía bruta del producto.

Los requerimientos mínimos de ciertos aminoácidos para los salmónidos y de vitaminas se detallan en la tabla 26 (Orna, 2010).

Tabla 26. Requerimientos nutricionales de algunos aminoácidos y vitaminas para los salmonoides.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Aminoácidos** | **(%)** | **Vitaminas** | **mg/kg peso vivo** | **Vitaminas** | |
| Arginina | 2,5 | Tiamina | 0,150 – 0,2 | Vitamina A | 8.000 – 10.000 U.I./kg de pienso |
| Histidina | 0,7 | Riboflavina | 0,50 – 1,0 |
| Lisina | 2,1 | Piridoxina | 0,25 – 0,50 | Vitamina D | 1.000 U.I./kg de pienso |
| Metionina | 0,5 | Biotina | 0,04 -0,08 |
| Cisteína | 1,0 | Acido nicotínico | 4,0 – 7,0 | Vitamina E | 125 U.I./kg de pienso |
| Triptófano | 0,2 | Ácido pantoténico | 1,0 – 2,0 |
| Treonina | 0,8 | Ácido fólico | 0,10 – 0,15 | Vitamina K | 15-20 mg/kg de pienso |
| Valina | 1,5 | Inositol | 18 – 20 |
| Leucina | 1,0 | Colina | 50 – 60 | Vitamina C | 450-500 mg/kg de pienso |
| Isoleucina | 1,5 | Cianocobalamina | 0,0002 – 0,0003 |

En la tabla 27 se detallan los requerimientos nutricionales de la trucha en sus diferentes etapas de vida, incluyendo los requerimientos específicos de aminoácidos, algunos de los ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas (FAO).

Tabla 27.Requerimientos nutricionales para la trucha (FAO).

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nutrientes (base seca)** | | | **Etapa de vida/ tamaño** | | | | |
| **Pre- alevín** | **Alevín** | **Juvenil** | **Reproductor** | **Adulto** |
| **Proteína cruda, % min** | | | 45-50 | 45 | 43 | 42 | 35-40 |
| **Aminoácidos, % min del pienso** | | | | | | | |
|  | **Arginina** | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|  | **Histidina** | | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
|  | **Isoleucina** | | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
|  | **Leucina** | | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
|  | **Lisina** | | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 |
|  | **Metionina** | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|  | **Fenilalanina** | | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
|  | **Treonina** | | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
|  | **Triptófano** | | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
|  | **Valina** | | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 |
| **Lípido crudo, % min** | | |  |  |  |  |  |
| **Ácidos grasos esenciales, % min** | | | | | | | |
|  | | **20:4n-6 (ARA)** | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
|  | | **20:5n-3 (EPA)** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|  | | **22:6n-3 (DHA)** | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| **Hidratos de carbono, % max** | | | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| **Fibra, crudo, % max** | | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **Energía, min kJ/g** | | | 15,5 | 15,5 | 15,5 | 15,5 | 15,5 |
| **Energía digestible, min kJ/g** | | | 15,5 | 15,5 | 15,5 | 15,5 | 15,5 |
| **Ratio protein/energía, mg/kJ** | | | 25 | 25 | 25 | 22 | 23 |
| **Macroelementos (%)** | | | | | | | |
|  | | **Calcio, max** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|  | | **Fósforo, min** | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
|  | | **Magnesio, min** | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
|  | | **Sodio, min** | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| **Microelementos, min mg/kg dry diet** | | | | | | | |
|  | | **Potasio** | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
|  | | **Hierro** | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
|  | | **Cobre** | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
|  | | **Manganeso** | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
|  | | **Zinc** | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
|  | | **Selenio** | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
|  | | **Yodo** | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| **Vitaminas, min UI/kg** | | | | | | | |
|  | | **Vitamina A** | 2 500 | 2 500 | 2 500 | 2 500 | 2 500 |
|  | | **Vitamina D** | 2 400 | 2 400 | 2 400 | 2 000 | 2 000 |
| **Vitaminas, min mg/kg** | | | | | | | |
|  | | **Vitamina E** | 25-100 | 25-100 | 25-100 | 25-100 | 25-100 |
|  | | **Vitamina K** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|  | | **Tiamina** | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
|  | | **Riboflavina** | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
|  | | **Piridoxina** | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
|  | | **Ácido pantoténico** | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
|  | | **Niacina** | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
|  | | **Ácido fólico** | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|  | | **Vitamina B12** | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
|  | | **Colina** | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
|  | | **Inositol** | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 |
|  | | **Biotina** | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0, 15 |
|  | | **Ácido ascórbico** | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |

La principal diferencia entre los requerimientos nutricionales de la trucha y la corvina son los lípidos: la trucha requiere un contenido de grasa en el pienso mayor (aprox. 24%) que la corvina (16%) (Estévez et al., 2011; Rema et al., 2019).

Un aspecto clave en la nutrición en acuicultura son los ácidos grasos araquidónico, EPA y DHA, puesto que son esenciales para el desarrollo y crecimiento de los peces (Bessonart, 1997).

En base a los requerimientos nutricionales de las dos especies de peces que se van a estudiar, la composición de los ingredientes alternativos obtenidos en la actividad 1 y teniendo en cuenta los diferentes porcentajes de inclusión definidos en cada pienso, se procedió a la formulación de las dietas en actividad 3.

### Selección de los ingredientes

El análisis de los diferentes ingredientes producidos durante la actividad uno ha permitido tener una idea sobre los valores nutricionales que tiene cada uno de ellos y el grado de idoneidad para su integración en los piensos de Trucha y de corvina.

### Microalgas

Se ha observado que las microalgas tienen un perfil bueno de proteínas y de ácidos grasos necesarios para el desarrollo y el buen crecimiento de las dos especies. Aunque es necesario para ello la mezcla de las 4 especies de microalgas para tener un compuesto equilibrado, y rico en ácidos grasos omega-3. La decisión de la mezcla ha sito tomada como una alternativa para compensar el desbalance entre *N. gaditana* y *I. galbana* en cuanto a DHA y EPA.

De otro lado, los valores observados en el combinado de las microalgas se ajustan a los requerimientos en valores de ácidos grasos y amino ácidos esenciales tanto de la corvina como de la trucha.

### Proteínas y aceites de agua de cocción

Los análisis de los dos productos recuperados del agua de cocción de atún han mostrado en el caso del aceite un ingrediente similar al aceite de pecado con altos niveles de EPA y DHA. Además de altos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados y alto nivel de omega 3 y omega 6 unos de los requerimientos esenciales en la dieta de ambas especies de peces.

Sin embargo, las proteínas recuperadas, aunque tiene un perfil de AA similares en proporción a la harina de pescado, contiene menos cantidad de lisina, arginina y metioninas esenciales en las dietas de los peces. Habría que compensar estas deficiencias con la adición de harina de pescado o de microalgas.

### Harina de insectos

El perfil nutricional observado durante el análisis de las dos harinas producidas muestra unas diferencias importantes entre la harina de *Acheta domesticus* y de *Hermetia illucens*, aunque los dos cumplen con las expectativas del porcentaje de proteínas que supera los 40% de la composición en ambos casos. Este porcentaje es bastante esperanzador ya que permite una sustitución importante de la harina de pescado. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos es bastante incompleto y necesita ser sustituido para compensar la falta o la poca cantidad de EPA y DHA en la harina producida. En este contexto, la harina de insecto y la de microalgas pueden ser complementarias.

En el caso de la harina de insectos el punto limitante fue la cantidad de aminas biógenas encontradas en *H. illucens*, que impide su uso como ingrediente dentro de dieta de los peces.

# **5. CONCLUSIONES**

En general, los resultados de los análisis indican la potencial aplicación de los ingredientes alternativos como sustitutos en pienso acuícola debido a la presencia de varios nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de trucha y corvina que pueden ser equilibrados con otros compuestos en formulación de los piensos. Las conclusiones alcanzadas en la Actividad 2 son las siguientes:

* La fracción lipídica recuperada de la cocción del atún presenta un alto contenido en EPA, DHA y ARA, ácidos grasos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los peces, y la fracción proteica presenta un alto contenido en proteínas, lo cual parece ser una buena opción para la inclusión en el pienso.
* La harina de insectos presenta contenidos altos en grasa, con ácidos grasos EPA y DHA, y en proteína, resultando también una buena alternativa de ingrediente en este tipo de productos.
* Las microalgas estudiadas muestran alto contenido en proteína y destaca por el elevado contenido en EPA.
* La combinación de estos cuatro ingredientes se muestra como una opción interesante a la hora de formular el pienso, debido a los diferentes compuestos que presenta cada uno de los ingredientes que resultan esenciales para el desarrollo de trucha y corvina.

# **6. OBSTÁCULOS ENCONTRADOS DURANTE LA EJECUCIÓN**

La Actividad 2 se realizó de forma satisfactoria. A pesar de ello, algunos obstáculos dificultaron la consecución de la actividad, como la limitación de materia prima para la realización de algunos de los análisis, lo que no permitió llevar a cabo la determinación de vitaminas. Por otro lado, en el caso de la harina de *H. illucens* se obtuvieron valores elevados de aminas biógenas en los análisis, lo que descarto su uso en la fabricación del pienso, sustituyéndose por más cantidad del otro insecto obtenido, grillo.

# **7. BIBLIOGRAFÍA**

AACC International (2012). Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 46-30.01 Crude Protein - Combustion Method.

Alvarado, J. (2009). Efecto de la frecuencia de alimentación semanal sobre el crecimiento de corvina *Argyrosomus regius* (asso, 1801) (Tesis de máster). Universidad de Cadiz, Cadiz.

Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R. (2016). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, *28* (1), 511-524.

Antonopoulou, E., Kousidou, E., Tserga, E., Feidantsis, K., Chatzifotis, S. (2014). Dietary lipid levels in meagre (*Argyrosomus regius*): Effects on biochemical and molecular indicators of liver. *Aquaculture*, *428–429*, 265-271.

Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, *2*, 164-173.

Bessonart, M. (1997). Efectos de las relaciones EPA/DHA y EPA/AA en el cultivo larvario de la dorada (S*parus aurata l*.) (Tesis). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Bigagli, E., Cinci, L., Niccolai, A., Biondi, N., Rodolfi, L., D´Ottavio, M., D´Ambrosio, M., Lodovici, M., Tredici, M. (2018). Preliminary data on the dietary safety, tolerability and effects on lipid metabolism of the marine microalga *Tisochrysis lutea*. *Algal Research, 34,* 244-249.

Bonfanti, C., Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S., Bandarra, N.M. (2018). Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal Research*, *29*, 242-248.

Campos, I., Matos, E., Maia, M.R.G., Marques, A., Valente, L.M.P. (2019). Partial and total replacement of fish oil by poultry fat in diets for European seabass (Dicentrarchus labrax) juveniles: Effects on nutrient utilization, growth performance, tissue composition and lipid metabolism. Aquaculture, 502, 107-120.

Cardinaletti, G., Messina, M., Bruno, M., Tulli, F., Poli, B.M., Giorgi, G., Chini- Zittelli, G., Tredici, M., Tibaldi, E. (2018). Effect 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.

Carvalho, H. Peres, R. Saleh, R. Fontanillas, G.Rosenlund, A. Oliva-Teles, (2018). Dietary requirement for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for fast growth of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fingerlings. *Aquaculture*, *488*,105-113.

Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Papaioannou, N., Pavlidis, M., Nengas, I., Mylonas, C.C. (2010). Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (Argyrosomus regius) juveniles. *Aquaculture*, *307 (*1–2), 65-70.

De Moura, L.B., Diógenes, A.F., Campelo, D.A.V., de Almeida, F.L.A., Pousão-Ferreira, P.M., Furuya, W.M., Oliva-Teles, A., Peres, H. (2018). Taurine and methionine supplementation as a nutritional strategy for growth promotion of meagre (Argyrosomus regius) fed high plant protein diets. *Aquaculture*, *497*, 389-395.

Deshmukh, S., Kumar, R., Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Processing Technology*, *191*, 232-247.

Estévez, A.,  Trevino, L., Kotzamanis,  Y., Karacostas,  I.,  Tort,  L., Gisbert,  E. (2011). Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. *Aquac. Nutr*., *17*, 572-582.

Ferreira, M., Cortina-Burgueño, A., Freire, I., Otero, a. (2018). Effect of nutritional status and concentration of Nannochloropsis gaditana as enrichment diet for the marine rotifer Brachionus sp. Aquaculture, 491, 351-357.

Ferreira, G.F., Ríos Pinto, L.F., Maciel Filho, R., Fregolente, L.V. (2019). A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *109*, 448-466.

Food and Agriculture Organization of the United Unions (FAO): Cultured Aquatic Species Information Programme *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). Available at: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en> (Junio 2019)

Food and Agriculture Organization of the United Unions (FAO): Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System: Rainbow trout - Nutritional requirements. Available at: <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/rainbow-trout/nutritional-requirements/en/> (Junio 2019)

García, S. et al. (2014).Time course of muscle fatty acid composition of cultured meagre (*Argyrosomus regius*) during the first sixteen months of a cage culture. Grasas y Aceites, 65 (1), e006,

Hita, E., Robles, A., Jiménez, M.J., Macías, M.D., Cerdán, L.E., González, P.A., Molina, E. (2015). Extraction of free fatty acids from wet Nannochloropsis gaditana biomass for biodiesel production. Renewable Energy, 75, 366-373.

Jasour, M.S., Wagner, L., Sundekilde, U.K., Larsen, B.K., Rasmussen, H.T., Hjermitslev, N.H., Hammershøj, M., Dalsgaard, A.J.T., Dalsgaard, T.K. (2018). Fishmeal with different levels of biogenic amines in aquafeed: Comparison of feed protein quality, fish growth performance, and metabolism. Aquaculture, 488, 80-89.

Kamau, E., Mutungi, C., Kinyuru, J., Imathiu, S., Tanga, C., Affognon, H., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., Fiaboe, K.K.M. (2018). Moisture adsorption properties and shelf-life estimation of dried and pulverised edible house cricket Acheta domesticus (L.) and black soldier fly larvae Hermetia illucens (L.). Food Research International, 106, 420-427.

Ma, R., Liu, X., Meng, Y., Wu, J., Zhang, L., Han, B., Qian, K., Luo, Z., Wei,Y., Li, C. (2019). Protein nutrition on sub-adult triploid rainbow trout (1): Dietary requirement and effect on anti-oxidative capacity, protein digestion and absorption. *Aquaculture*, *507*, 428-434.

Martínez-Llorens, S., Espert, J., Moya, J., Cerdá, M.J., Tomás- Vidal, A. (2011). Growth and nutrient efficiency of meagre (Argyrosomus regius, Asso1801) fed extruded diets with different protein and lipid level. International Journal of Fisheries and Aquaculture, 3(10), 195-203.

Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein Determination-Method Matters. Foods (Basel, Switzerland), 7(1), 5.

Monfort, M. C. (2010). Studies and Reviews N° 89: Present market situation and prospects of meagre (Argyrosomus regius), as an emerging species in Mediterranean Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Italia.

Oonincx, D. G. A. B., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., & Van Loon, J. J. A. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS ONE*, *10*(12), [e0144601].

Orna, E. (2010). Manual de alimento balanceado para truchas. Perú.

Opstvedt, J., Mundheim, H.,  Nygård, E., Aase, H., Pike, I.H. (2000). Reduced growth and feed consumption of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish meal made from stale fish is not due to increased content of biogenic amines. Aquaculture, 188 (3), 323-337.

Rema, P., Saravanan, S., Armenjon, B., Motte, C., Dias, J. (2019). Graded Incorporation of Defatted Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Diet Improves Growth Performance and Nutrient Retention. *Animals*, *9*, 187.

Ribeiro, J.C., Lima, R.C., Maia, M.R.G., Almeida, A.A., Fonseca, A.J.M., Cabrita, A.R.J., Cunha, L.M. (2019). Impact of defatting freeze-dried edible crickets (Acheta domesticus and Gryllodes sigillatus) on the nutritive value, overall liking and sensory profile of cereal bars. LWT- Food Science and Technology. 113. 1-7.

Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M., Otero, A. (2009). Nutritional value of the cryptophyte Rhodomonas lens for Artemia sp. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 381(1), 1-9.

Tapia-Salazar, M., Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Pike, I.H., Smith, T.K., Harris, A., Nygård, E.,  Opstvedt, J.  (2004). Effect of fishmeal made from stale versus fresh herring and of added crystalline biogenic amines on growth and survival of blue shrimp Litopenaeus stylirostris fed practical diets. Aquaculture, 242 (1), 437-453.

Teuling, E., Wierenga, P., Agboola, J., Gruppen, H., Schrama, J. (2019). Cell wall disruption increases bioavailability of *Nannochloropsis gaditana* nutrients for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, *499*, 269-282.

Tibaldi, E., Chini Zitelli, G., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M.R., Poli, B.M. (2015). Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis sp.* (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, *440*, 60-68.

Tomas A., Martinez S., Pereira A., Monino A. y Jover M. 2008. Tasa de alimentacion optima para el crecimiento de la corvina (Argyrosomus regius). IV Jornadas de Acuicultura del Litoral Suratlantico, Cartaya (Huelva), 16-17 Abril.

Velazco, J.(2014). Contribución al estudio de las necesidades nutritivas de la corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

Wei, Y., Shen, H., Xu, W., Pan, Y., Chen, J., Zhang, W., Mai, K. (2019). Replacement of dietary fishmeal by Antarctic krill meal on growth performance, intestinal morphology, body composition and organoleptic quality of large yellow croaker Larimichthys crocea. Aquaculture, 512, 734281.

Yi, L., Lakemond, C.M.M., Sagis, L.M.C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., van Boekel, A.A.J.S. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. Food Chemistry, 141(4), 3341-3348.

Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J.L., Johansson, D.P., Landberg, R., Langton, M. (2016). Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. PLOS ONE 11(2): e0147791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147791>

# **8. ANEXOS**