



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CS. VETERINARIAS
ESCUELA DE ACUICULTURA**

TESIS DE GRADO

Utilización digestiva de dietas con distintos niveles de inclusión de
harina de lupino (*Lupinus albus*) en juveniles de trucha arco iris
(*Oncorhynchus mykiss*)

*Tesis para optar al grado de licenciado
en ciencias de la acuicultura*

Alumno: Patricio Jermán Saez Albornoz.
Profesor guía: Aliro Bórquez Ramírez.

Temuco, 2003

RESUMEN

Se llevó a cabo un bioensayo de digestibilidad en el hatchery de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco, con el fin de determinar los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) total, proteínas, extracto etéreo (E.E.) y extracto no nitrogenado (E.N.N.), además de la evaluación de energía bruta (EB), energía digestible (ED) y relación proteína digestible y energía digestible (PD/ED), para una dieta comercial (Control), y dietas con 20 (D1), 30 (D2) y 40 (D3) por ciento de incorporación de harina de lupino (*Lupinus albus*), evaluadas en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Para la colección de heces se utilizó una columna de decantación (modificación del sistema “Guelph”).

Se utilizaron tanques de fibra de vidrio de forma cilindro cónica de volumen $0,5 \text{ m}^3$ de volumen. En cada tanque fueron distribuidos al azar 15 peces de $101,2 \pm 1,02 \text{ g}$ y mantenidos por 10 días para su aclimatación antes de comenzar el bioensayo. Los tratamientos se ensayaron por triplicado, con alimentación manual “*ad libitum*” los siete días de la semana una vez por día. La temperatura del agua durante la colección de heces osciló entre $13 - 15 \text{ }^\circ\text{C}$ como promedio. La colección de heces se realizó 24 horas post alimentación y fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4200 r.p.m., luego envasadas y conservadas en freezer.

Los resultados mostraron que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las dietas para CDA total, proteínas, E.E. y E.N.N. El mayor CDA total fue obtenido por D3 alcanzando un 85,41%, mientras el más bajo lo registró la dieta Control con un 66,86 por ciento. En el caso del CDA para proteínas, los resultados variaron entre 96,51 y 88,92 por ciento para D3 y dieta Control respectivamente. Con respecto al CDA para el E.E., el valor más elevado fue alcanzado por D1 con 97,64 por ciento; por el contrario, la dieta Control alcanzó 92,80 por ciento. El porcentaje de CDA más elevado, con respecto al E.N.N., fue obtenido por D3 con un 81,68 por ciento, mientras la dieta Control, alcanzó 49,65 por ciento.

Con respecto a la evaluación energética de las dietas, los resultados indicaron que D2 contenía la mayor cantidad de energía bruta (22,58 Mj/Kg). Para el caso de energía digestible, el mayor valor lo presentó D3 (12,24 por ciento). Por otra parte, la mejor proporción de PD/ED fue presentada por D3 con 18,96 g/MJ.

La dieta Control, fue evidentemente mejorada, tanto en términos de requerimientos nutritivos de la especie en que fue evaluada (*Oncorhynchus mykiss*), así como en términos de utilización digestiva, tras la sustitución con los distintos niveles de harina de lupino.

ABSTRACT

A digestibility trial was developed in the hatchery of the Escuela de Acuicultura of the Universidad Católica de Temuco, in order to determine the total apparent digestibility coefficient (ADC), protein, ethereal extract and non nitrogenated extract, besides the evaluation of gross energy (GE), digestible energy (DE) and digestible protein and digestible energy relation, for a commercial diet (Control), and diets with 20 (D1), 30 (D2), and 40 (D3) percent of incorporation of lupin (*Lupinus albus*) flour, evaluated in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A sediment column was used for the collection of feces (a “Guelph” system modification).

Cylinder – conical shaped fiberglass tanks with 0.5 m³ of volume were used. In each tank, 15 fish of 101,2 ± 1,02 g were randomly distributed, and were kept for ten days for their acclimation before starting the assay. The treatments were tested by triplicate, with “*ad libitum*” manual feeding seven days a week, once a day. The water temperature during the feces collection varied between 13 – 15 °C average. The feces collection was done 24 hours after feeding and they were centrifuged for 15 minutes at 4200 r.p.m., then packed and preserved in a freezer.

The results showed significant ($p < 0,05$) differences between all the diets for total ADC, protein, ethereal extract and non-nitrogenated extract. The best total CDA was obtained for D3, reaching 85,41%, while the lower was registered for the Control diet with a 66,86%. In the case of CDA for proteins, the results varied between 96.51 y 88.92 percent for D3 and Control diets respectively. Regarding the CDA for E.E., the highest value was reached by D1 with 97,64 percent; on the contrary, the Control diet reached 92,80 percent. The highest percentage of CDA, regarding the E.N.N., was obtained by D3 with an 81,68 percent, while the Control diet reached 49,65 percent.

Regarding the energetic evaluation of the diets, the results showed that D2 contained the highest amount of gross energy (22,58 MJ/Kg). In the case of ED, the highest value was shown by D3 (12,24). On the other hand, the best proportion of PD/ED was shown by D3 with 18,96 g/Mj.

The Control diet was clearly improved, both in terms of nutrition requirements of the species in which it was evaluated (*Oncorhynchus mykiss*), as in terms of digestive usefulness, after the substitution with the different levels of lupin flour.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	11
2.1. Coeficientes de digestibilidad	11
2.1.1. Coeficientes de digestibilidad aparente v/s coeficiente de digestibilidad verdadero	12
2.1.2. Método directo e indirecto	13
2.1.3. Colección de heces	15
2.1.4. Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente para ingredientes	18
2.2. Importancia y problemática de la harina de pescado como fuente proteica en dietas para la acuicultura	19
2.3. Fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado en dietas para la acuicultura	21
2.3.1. Proteínas de origen animal	21
2.3.1.1. Harinas de subproductos de animales invertebrados	21
2.3.1.2. Harinas de subproductos de animales vertebrados	21
2.3.2. Proteínas unicelulares (PUC)	24
2.3.3. Proteínas de origen vegetal.....	25
2.3.3.1. Oleaginosas.....	25
2.3.3.2. Cereales	27
2.3.3.4. Leguminosas.....	28
2.4. Uso de lupino en dietas para la acuicultura.....	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo general	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. METODOLOGÍA.....	34
4.1. Condiciones generales del mantenimiento de los peces.....	34
4.2. Dietas	35
4.3. Alimentación y colección de heces	36
4.4. Análisis químicos de dietas y heces.....	37
4.4.1. Humedad	37
4.4.2. Cenizas	38
4.4.3. Proteínas.....	38
4.4.4. Extracto etéreo (E.E.).....	39
4.4.5. Fibra	39
4.4.6. Extracto no nitrogenado (E.N.N.).....	40
4.4.7. Determinación de óxido crómico	40
4.5. Parámetros fisiológicos evaluados	40
4.5.1. Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente total y para nutrientes	40
4.5.2. Determinación de energía bruta.....	41
4.5.3. Determinación de energía digestible	41
4.5.4. Relación proteína digestible y energía digestible	42

4.6. Tratamientos estadísticos	42
5. <i>RESULTADOS</i>	43
5.1. Composición proximal de las heces	43
5.2. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDAs)	44
5.3. Evaluación energética de las dietas.....	45
6. <i>DISCUSIÓN</i>	47
7. <i>CONCLUSIONES</i>	54
8. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	55

1. INTRODUCCIÓN

La alimentación en la producción de salmónidos ocupa el primer lugar en lo que a costos se refiere, lo que constituye uno de los factores críticos dentro de esta actividad productiva.

El principal ingrediente en la producción de alimento para la acuicultura en Chile es la harina de pescado. Chile es uno de los principales productores de este insumo a escala mundial, como consecuencia de la abundante pesquería y fauna pelágica que poseen sus costas, este hecho constituye una gran ventaja, con respecto a países (Aquanoticias Internacional, 1998). Sin embargo, a partir de la década de los noventa, Chile ha incurrido paulatinamente en la importación de harina de pescado, alcanzando durante el año 2000, volúmenes en torno a las noventa y cinco mil toneladas métricas importadas, debido a la mayor demanda de este de este producto (Tacon, 2003).

La harina de pescado es una fuente rica en proteínas, lípidos, vitaminas y minerales que juegan también un importante papel en la nutrición animal (Windsor y Barlow, 1984), la composición de la harina de pescado dependiendo del lugar de fabricación puede estar constituida de un 6 a 12% de grasa cruda, 6 a 10 % de humedad, 1 a 5 % de sal y arena, 12 a 18 % de ceniza cruda, antioxidante mínimo 100 ppm y un 64 a 70% de proteína cruda (NRC, 1993). Desde la década de los noventa la harina y aceite de pescado vienen experimentando una alza en los precios, esto a causa de la influencia que el fenómeno de “El niño” ejerce sobre nuestras costas, produciendo una migración de los jureles de mayor

tamaño (materia prima fundamental de éste producto) hacia zonas más profundas, produciendo alzas en los precios (Aquanoticias 1998). Además, el descubrimiento de los primeros casos de encefalopatía bovina espongiforme (BSE) en Alemania y Francia (Gill, 2001), esta afectando en forma dramática la disponibilidad global de ingredientes proteicos libres de esta enfermedad.

Las proteínas de la dieta son utilizadas por el organismo para tres fines fundamentales: mantenimiento, reparación de los tejidos dañados y crecimiento o formación de nuevas estructuras proteicas (De la Higuera, 1988a). En muchas dietas animales, la proteína es la porción más cara y usualmente es el primer nutriente que se muestra en la formulación de una dieta (El- Sayed, 1999). Los requerimientos proteicos de peces de agua fría son generalmente altos: mayores al 30% de la dieta (Fauconneau, 1988).

Todos los hechos anteriormente analizados, han determinado que en los últimos 10 años se busque disminuir la dependencia de la harina de pescado como principal materia prima en las dietas de peces, por lo cual se busca reemplazar ésta fuente de proteína por otras de tipo animal o vegetal. Desde este punto de vista se ha llevado a cabo un gran número de trabajos en los que se han evaluado numerosas fuentes proteicas, las que se incluyen en proporciones variables en piensos para peces (Thiessen, *et al.*, 2001; Booth, *et al.*, 2001; Burel, *et al.*, 2000a; Burel, *et al.*, 2000b; Refstie, *et al.*, 2000; Carter y Hauler, 2000; Burel *et al.* 1988;).

En lo que se refiere a proteína de origen animal, se componen principalmente de subproductos de distintas industrias y que no son utilizables para consumo humano. Generalmente se emplean como fuentes de proteína secundarias y, aún en mezcla, rara vez se incluyen a niveles superiores al 20 por ciento de los piensos comerciales. Dentro de estas materias primas cabe destacar harina de sangre, harina de carne y hueso, harina de plumas, etc. (Cheng y Hardy, 2002; Satoh, *et al.*, 2002; Jahan, *et al.*, 2001; Mendoza, *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2000; Bureau *et al.*, 2000; Dong, *et al.*, 1993).

Con respecto a proteína de origen vegetal, estas materias primas están adquiriendo cada vez mayor importancia en la fabricación de piensos para peces, su competitividad frente a las harinas de pescado estriba fundamentalmente en, su mayor producción, ya que no es limitada por la productividad natural del medio, y porque muchas de ellas son subproductos agroindustriales. Por consiguiente, los precios pueden llegar a ser muy competitivos. En este sentido la harina de soya ha sido incorporada a las dietas por algunas empresas nacionales en proporciones que van hasta un 15 por ciento (Aquanoticias Internacional, 1997). También a nivel de investigación se utiliza harinas de Arveja (Davis *et al.*, 2001; Gouveia y Davies, 2000) harinas de raps (Kissil *et al.*, 2000; Mwachireya *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 1998), harinas de lupino en varias proporciones (Glencross *et al.*, 2002; Faranghi y Carter, 2001; Burel *et al.*, 2000a., 2000b, 1998; Carter y Hauler, 2000), harinas de maravilla (Sanz *et al.*, 1994), harinas de maíz (Allan *et al.* 2000), entre otras.

A la hora de valorar el potencial de una materia prima o de una dieta formulada, se hace necesario medir su digestibilidad, esto es la cuantificación del proceso global de la

digestión y la absorción de un nutriente. Su medición consiste básicamente en cuantificar que cantidad de un nutriente o dieta en particular es digerida y absorbida por el pez; y cuanto de la misma es eliminada a través de las heces.

Las investigaciones de digestibilidad de alimentos en peces son relativamente recientes. La mayoría de estas investigaciones han sido basadas en la introducción de un indicador inerte de la digestión, tal como el óxido crómico, (Vandenberg y De la noüe, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Booth *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Arndt *et al.*, 1999; Carter y Hauler, 2000; Forster, 1999). Otros indicadores usados en acuicultura son óxido de Itrio (Y_2O_3) (Reftie *et al.*, 2000; Storebakken *et al.*, 2000), óxido de Lantano (La_2O_3) (Austreng *et al.*, 2000), dióxido de titanio (TiO_2) (Vandenberg y De la noüe, 2001; Weatherup y McCracken, 1988), dióxido de silicio (SiO_2) (Arndt *et al.*, 1999), óxido de iterbio (Yb_2O_3) (Thodesen y Storebakken, 1998) entre otros. En los estudios de digestibilidad para peces resulta difícil separar las heces del agua y evitar su contaminación con dieta no ingerida. Sin embargo, el "Sistema Guelph" diseñado por (Cho *et al.*, 1985) resulta muy apropiado para este fin. Este sistema posee la ventaja de que los peces no están expuestos a estrés, excretan en forma natural, mientras las heces resultantes ingresan por un tubo decantador ubicado al exterior del tanque en donde se realiza la extracción, otra ventaja relacionada a éste método es que no limita el tamaño de los peces a utilizar en un bioensayo (Hardy, 1997).

Recientemente, en Chile muchas empresas han iniciado los estudios de digestibilidad de dietas donde se incluye ingredientes vegetales. En este sentido el bioensayo realizado en el presente estudio, se enmarca en la búsqueda de fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado, con posibilidades de ser incluidas en dietas para peces en el ámbito industrial, lo cual se puede traducir en una importante disminución en los costos de producción, y por otra parte bajar la dependencia de este sector productivo con respecto a la harina de pescado en el rol de principal insumo proteico. En este caso se evaluó el lupino blanco (*Lupinus albus*), leguminosa de elevada concentración proteica, y que además puede representar un foco de desarrollo para la IX región de la Araucanía, principal productor de este insumo a nivel nacional.

La presente tesis muestra un estudio de digestibilidad con cuatro dietas: una comercial (Control), y tres dietas experimentales, basadas en el reemplazo parcial (20, 30 y 40 por ciento), del contenido de harina de pescado de la dieta Control por harina de lupino. Este estudio fue realizado a petición del proyecto del Fondo de Desarrollo e Innovación (FDI) de CORFO: "Diversificar el uso de lupino, utilizándolo como fuente proteica alternativa en la alimentación de la salmonicultura" que desarrolla la Universidad Católica de Valparaíso.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Coeficientes de digestibilidad

El valor nutricional de un alimento o ingrediente se basa tanto en la composición química de éste, como en la proporción en que el pez puede absorberlo y utilizarlo (NRC, 1993). Por tanto, la necesidad de contar con herramientas confiables para el estudio de la utilización de ingredientes se ha traducido en el desarrollo de numerosos métodos para determinar la proporción de nutriente que es absorbido por un animal (Vandenberg y De la noüe, 2001, 2001). En ese sentido Allan *et al.*, (2000), señala que la determinación de la digestibilidad es el primer paso en la evaluación del potencial de un ingrediente para el uso en dietas para especies en cultivos acuícola.

Digestión, estrictamente hablando, es la transformación de los alimentos en el intestino a través de procesos mecánicos, químicos y enzimáticos en sus partes constituyentes, volviéndolas solubles y disponibles para su absorción. Absorción es el proceso por el cual las moléculas e iones son absorbidos por los tejidos celulares del intestino. Digestibilidad por tanto es una medida de la capacidad biológica de un nutriente o energía de un alimento o ingrediente (Stickney, 2000), es decir la fracción de un ingrediente o energía en el alimento ingerido que no es excretado a través de las heces (NRC, 1993).

De acuerdo a lo descrito por varios autores (Arndt *et al.*, 1999; Bureau y Cho, 1999; Refstie *et al.*, 2000; Storebakken *et al.*, 2000) la determinación de los coeficientes de

digestibilidad (CDs), en términos generales, se basa en la alimentación de un grupo de peces con una dieta, cuyo contenido nutricional (proteína, lípidos, cenizas, fibra cruda, etc.), es conocido. Luego, una vez consumido el alimento, las heces producidas son colectadas para determinar su composición química, y por diferencia, se obtiene la proporción que el pez pudo digerir de dicho alimento. De esta manera se obtienen CDs tanto para micro y macro nutrientes y energía (Sorensen *et al.*, 2002; Richie y Brown, 1999).

2.1.1. Coeficientes de digestibilidad aparente v/s coeficiente de digestibilidad verdadero

Al realizar un bioensayo de digestibilidad se debe saber que las heces están compuestas por alimento no digerido y residuos corporales no reabsorbidos, por tal motivo todos los animales excretan nutrientes como proteínas, lípidos y otras materias incluso cuando no las han ingerido a través de la dieta (Hardy, 1997). Esos residuos son restos de células mucosas, enzimas digestivas, muco proteínas y otras secreciones liberadas en el tracto digestivo por el animal, sumado a los residuos de la microflora que habita el tracto digestivo (Sanz *et al.*, 1994). La proporción de nutrientes residuales que no se originan directamente del alimento ingerido, sino que del mismo animal, se denomina pérdidas endógenas intestinales (PEI) (Bureau y Cho, 1999; Hardy, 1997). La cuantificación de dichas pérdidas, produce la diferencia entre coeficiente de digestibilidad verdadera (CDV) y coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) del alimento o ingrediente (Bureau y Cho, 1999). El CDV toma en cuenta ese material endógeno y lo remueve de los cálculos.

Conforme a lo señalado por Stickney (2000); para estimar dicho componente endógeno contenido en las heces, se debe alimentar dos grupos de peces, uno con una dieta que contenga el nutriente avaluado (D1) y otro grupo de peces con una dieta libre de aquel nutriente (D2), posteriormente, el coeficiente de digestibilidad verdadera, se determina de acuerdo a la siguiente fórmula (Hardy, 1997):

$$CDV^1 : 1 - \frac{(Cr_2O_3 \text{ en dieta } (\%))}{Cr_2O_3 \text{ en Heces } (\%)} \times \frac{(\text{Nutriente en heces D1 } (\%) - \text{Nutriente en heces D2 } (\%))}{\text{Nutriente en dieta } (\%)}$$

Sin embargo, la diferencia entre CDA y CDV es aproximadamente 5%, y desde un punto de vista práctico el impacto es pequeño (Hardy, 1997), además en peces mantenidos con un consumo de alimento alto, la contribución de PEI al nitrógeno fecal total es mínimo (Bureau y Cho, 1999). Por lo tanto, en la práctica, los valores de CDAs son bastante adecuados, es decir, reales, confiables y repetibles. En el mismo sentido, Sanz *et al.* (1994), confirma que el consumo de dietas con proteína es suficiente, y que el error al obviar componente endógenos es mínimo.

2.1.2. Método directo e indirecto

Desde un punto de vista metodológico, la determinación de CDAs, se puede realizar a través de un método directo o indirecto. El método directo se basa en la medición de todo el alimento consumido por el pez además de la recolección de todas las heces resultantes.

¹ Coeficiente de digestibilidad verdadero.

Para esto, de acuerdo a NRC (1993); se usa una modificación acuática de la cámara de metabolismo diseñada para estudios con animales terrestres. Sin embargo, este método ha sido muy criticado, debido a que el pez se encuentra inmobilizado, forzado a comer y además estresado, por lo tanto la utilización del alimento puede ser afectada. Este método se ha restringido para trucha arco iris y los intentos de adaptación a otras especies ha resultado igualmente negativo.

Por otra parte, el método indirecto, toma en cuenta que la colección de todas las heces producidas por un grupo de peces no es una tarea práctica, por tanto se basa en la colección de una cantidad representativa de muestra libre de partículas de alimento no consumidas, y además, el uso de un indicador de digestión mezclado homogéneamente con el alimento (Bureau y Cho, 1999). De acuerdo a Vandenberg y De la noüe (2001), tanto componentes indigestibles internos presentes en la dieta como la adición de marcadores indigestibles externos pueden cumplir el papel de indicadores de digestibilidad. Las características necesarias para considerar una sustancia como indicador es que debe ser indigestible, no tóxico, fácil de mezclar con el alimento, relativamente fácil de analizar para determinar la concentración en la dieta y heces, y lo más importante es que debe pasar a través del tracto digestivo al mismo tiempo en que lo hace el alimento. (Hardy, 1997; Austreng *et al.*, 2000).

Tanto fibra cruda o fuentes de cenizas insolubles en ácido, como arena lavable en ácido han sido usadas como indicador indigestible interno (Vandenberg y De la noüe, 2001; Weatherup y McCracken, 1988), pero los más usados a escala mundial son los marcadores

indigestibles externos, dentro de ellos el mas común es el óxido de cromo (Cr_2O_3) (Bórquez y Alarcón, 2002; Vandenberg y De la noüe, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Booth *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Arndt *et al.*, 1999; Carter y Hauler, 2000; Forster, 1999; Erfanullah y Jafri, 1998; Watherup y McCracken, 1998; Storebakken y Austreng, 1987). Otros indicadores de digestibilidad usados en acuicultura corresponden a óxido de Itrio (Y_2O_3) (Reftie *et al.*, 2000; Storebakken *et al.*, 2000), óxido de Lantano (La_2O_3) (Austreng *et al.*, 2000), dióxido de titanio (TiO_2) (Vandenberg y De la noüe, 2001; Weatherup y McCracken, 1988), dióxido de silicio (SiO_2) (Arndt *et al.*, 1999), óxido de iterbio (Yb_2O_3) (Thodesen y Storebakken, 1998). También existen referencia sobre productos como polietileno, Celitetm, Sipernat, y el microtraza Fe-Ni (Vandenberg y De la noüe, 2001).

2.1.3. Colección de heces

Otro factor relevante al realizar un bioensayo de digestibilidad es la colección de heces, debido a que en el ambiente acuático, tanto el alimento como las partículas fecales transitan en el mismo medio, por tal motivo la extracción de las heces del agua sin la contaminación de éstas con alimento no consumido resulta esencial para el buen cometido de la experiencia. En la actualidad existe una variada gama de técnicas para llevar a cabo esta operación. Dentro de las más usadas a escala mundial se encuentra la obtención de heces por presión abdominal del pez (stripping) previamente anestesiado (Vandenberg y De la noüe, 2001; Reftie *et al.*, 2000; Arndt *et al.*, 1999; Storebakken *et al.*, 2000; Thodesen y Storebakken, 1998; Storebakken y Austreng, 1987). La ventaja al utilizar este método, es prescindir de tanques especiales para la colección. En contraste, la gran objeción

a este método de muestreo directo del intestino es que el material puede ser removido antes de que se complete el tiempo de retención natural de las heces alterando así la dinámica de la digestión, lo que se traduce finalmente en una estimación menor de la digestibilidad de los nutrientes (particularmente de la proteína) debido a la contaminación de las heces con material endógeno que de otra manera sería reabsorbido antes de la excreción de las heces. (Bureau y Cho, 1999). Por otra parte el uso de anestésicos para minimizar el estrés induce a una excreción espontánea, pudiendo dañar la membrana intestinal (Vandenberg y De la noüe, 2001). De acuerdo con Hardy (1997), indica que ésta técnica requiere peces que a lo menos deben pesar entre 15-20 g., impidiendo mediciones de digestibilidad con peces menores. Otras técnicas similares a ésta son succión anal y disección implicando esta última el sacrificio de los peces.

Otro método es el desarrollado por Cho *et al.* (1985), basado en una columna de decantación para separar las heces del efluente de agua proveniente del tanque contenedor de peces (sistema Guelph). Este sistema posee la ventaja de que los peces no están expuestos a estrés y excretan en forma natural, mientras las heces resultantes ingresan a un tubo decantador ubicado al exterior del tanque en donde se realiza la extracción, otra ventaja relacionada a éste método es que no limita el tamaño de los peces a utilizar en un bioensayo (Hardy, 1997). Por el contrario existe la desventaja de que se debe contar con tanques especialmente diseñados con una columna de decantación, Pero sin duda, el mayor problema que presenta la colección pasiva de heces, es la lixiviación a la que está expuesto el material soluble que compone las heces (Bureau y Cho, 1999; Hardy, 1997). De acuerdo a NRC (1993), una cantidad significativa del nitrógeno fecal en Trucha arco iris

corresponde a líquido y puede ser perdido a través del efluente de agua. Sin embargo, Vandenberg y De la noüe (2001), señala que la pérdida de nutrientes a través de la lixiviación es mínima cuando las heces permanecen quietas antes de ser colectadas; en adición, Regost *et al.* (1999) señala el uso de un 2 por ciento de alginato de sodio como aglutinante en la dieta para mejorar la cohesión de las heces y evitar la lixiviación a la que puedan estar sometidas.

Existe por otra parte la posibilidad de extraer heces sifoneando desde el fondo del tanque (Siphoning) (Erfanullah y Jafri, 1998) o a través del uso de redes (Netting) (Hardy, 1997), estas técnicas también están expuestas a la lixiviación del material soluble de las heces, sin embargo, no producen estrés en los peces, ni limita el tamaño de los peces a utilizar.

El método denominado coladores rotatorios desarrollado por Choubert (Vandenberg y De la noüe, 2001; Bureau y Cho, 1999; Weatherup y McCracken, 1988; Hardy, 1997), se basa en la remoción de heces por medio de un sistema de filtración continua (sistema Stepee); para llevar a cabo la colección a través de este método se requiere de tanques especiales o sistema de coladores, pero al igual que en las metodologías anteriormente mencionadas, no producen estrés ni limita el tamaño de los peces. Similares ventajas y desventaja presenta el sistema denominado columna TUF (Bureau y Cho, 1999), en el cual las heces se colectan mientras el efluente de agua atraviesa por una columna de filtración.

2.1.4. Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente para ingredientes

El CDA puede ser determinado tanto para una dieta como para un ingrediente en particular (Hardy, 1997). En este sentido y considerando que los ingredientes por si solo no constituyen una dieta completa, éste debe ser mezclado con una dieta de referencia estándar nutricionalmente balanceada que permita desarrollar una buena captación del alimento y normal funciones fisiológicas por parte de los peces (Bureau y Cho, 1999); la proporción de la mezcla usada generalmente es de 3:7, entre el ingrediente y la dieta de referencia respectivamente (Booth *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Erfanullah y Jafri, 1998; Hardy, 1997). Se determina en primera instancia el CDA para la dieta de referencia y luego el CDA para la dieta mezclada con el ingrediente testeado, finalmente el CDA de ingrediente para cada nutriente en particular se obtiene tras establecer la diferencia entre ambos resultados (Forster, 1989). Hardy (1997), señala que se debe asumir especial consideración entre la concentración del nutriente testeado en el ingrediente y en la dieta, ya que si la dieta de referencia contiene tal nutriente en una proporción elevada en comparación al ingrediente, se dificulta la obtención del CDA para el nutriente, ya que el efecto del insumo sobre la digestibilidad puede perderse dentro de la dieta. Otra consideración que produce variaciones en el CDA utilizando este método es la proporción en la que se incluye el ingrediente en la dieta final (Forster, 1999).

De acuerdo a Cho y Bureau (2001); la alta variabilidad que existe en la literatura con respecto a los CDAs se debe básicamente a diferencias en el método de colección de heces, errores experimentales (condiciones experimentales no óptimas, lixiviación, errores

analíticos, cálculos erróneos, etc.), diferencias en la manufacturación y composición química de los ingredientes (técnicas de procesos, daño por calor, etc.); y diferencias biológicas y ambientales (especie y temperatura del agua).

Sin embargo, con respecto a la temperatura del agua, NRC (1993), expone que los CDAs se ven levemente afectados, cuando los peces son mantenidos dentro del rango normal de crecimiento para la especie.

2.2. Importancia y problemática de la harina de pescado como fuente proteica en dietas para la acuicultura

El cambio a prácticas de cultivo intensivo ha contribuido a un aumento global en la producción de la industria acuícola, este cambio solo ha sido posible gracias al aumento en la utilización de dietas formuladas (Allan *et al.* 2000). Como consecuencia la alimentación representa sobre el 50% de los costos operativos en la acuicultura intensiva (Vielma *et al.*, 2000). El desarrollo de los alimentos comerciales se ha basado tradicionalmente en la harina de pescado como fuente principal, debido a su alto contenido proteico y su perfil balanceado de amino ácidos esenciales (NRC, 1993). La harina de pescado es también una excelente fuente de ácidos grasos esenciales, energía digestible, minerales y vitaminas (El-sayed., 1999) Por tanto, no es sorpresa que esta materia prima sea la fuente proteica más costosa en alimentos tanto acuícola como de otras industrias.

De acuerdo a Hardy (2000), la producción de este insumo promedió aproximadamente 6,5 millones de toneladas métricas (TM) durante la década pasada, y las perspectivas de un aumento en la producción son bajas.

A comienzos de la década de los setenta se presentó una reducción mundial de la disponibilidad de la harina de pescado causada por una significativa reducción en la cosecha de anchoveta Peruana. (Adelizi *et al.*, 1998), en forma posterior, durante el pasado fenómeno de “El niño” la captura de peces en Chile y Perú disminuyó dramáticamente (Barlow, 2001), y como consecuencia la producción de harina de dicho insumo se redujo aproximadamente en un treinta por ciento en Sudamérica, causando una disminución del veinte por ciento en la producción global (Watanabe, 2002). A pesar del estancamiento en los niveles de producción y las variaciones ocasionales que puedan ocurrir, la demanda global por este insumo continúa creciendo. De acuerdo a Iffo (2001), la estimación para el año 2010 se utilizarán 3,5 millones de TM de harina de pescado en dietas para la acuicultura, es decir, un 60 por ciento de la producción mundial actual.

Debido a esta situación, mas la necesidad de competir con otro tipo de industrias por esta fuente proteica, se ha generado la necesidad, en formuladores de dietas para peces, de buscar y evaluar fuentes alternativas de proteínas, básicamente harinas de sub-productos animales y harinas de origen vegetal (Cheng *et al.*, 2002).

2.3. Fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado en dietas para la acuicultura

2.3.1. Proteínas de origen animal

2.3.1.1. Harinas de subproductos de animales invertebrados

Solo una pequeña porción de subproductos de animales invertebrados ha sido usada en alimentos para la acuicultura como reemplazantes de la harina de pescado (Tacon, 1994), y los ingredientes incluyen Harina de pupa de gusano de seda (*Bombix mori*), harina de gusano terrestre (*Eisenia foetida*) y mezcla de zooplancton (mezcla de copépodos y cladóceros en razón 1:6).

2.3.1.2. Harinas de subproductos de animales vertebrados

Las harinas de subproductos de animales vertebrados han sido usadas en dietas animales desde mediados del siglo XIX (Cheng *et al.*, 2002), y actualmente constituyen la segunda mayor fuente de proteína animal usada en alimentos para la acuicultura (después de la harina de pescado). Una amplia variedad de estos insumos ha sido evaluada como potencial reemplazante de la harina de pescado (Tacon, 1994). Por lo general disponen de altos contenidos proteicos y buenos perfiles de amino ácidos esenciales, sin embargo, pueden ser deficientes en uno o más de ellos (El-sayed, 1999).

En primer lugar la harina de subproductos avícolas (HSA) que corresponde al producto reciclado de los desperdicios durante la producción avícola, y esta constituido por

las porciones no comestibles de estos desechos, sin incluir las plumas (Abdel-Warith *et al.*, 2001). La HSA contiene un porcentaje de proteína promedio de un 60% aproximadamente y es deficiente en el contenido de lisina. Presenta además un bajo contenido de ceniza comparado con la harina de pescado (NRC, 1993). La producción anual total de este producto en EE.UU. es de 0,443 millones de TM y alcanza un precio cercano a los 300 dólares por TM (Alimentos Balanceados para Animales, 1999).

Algunas variedades de este insumo utilizados actualmente en alimentos para mascotas corresponden a HSA grado alimento balanceado (62,2 por ciento PC), HSA tipo Prime (66,2 por ciento PC) y HSA refinada (70,1 por ciento PC) y que al ser evaluadas en Trucha arco iris presentaron CDA para la proteína de 83,1; 84,8 y 87,1 por ciento respectivamente (Cheng *et al.*, 2002).

Cuando se agrega este tipo de harina a un nivel mayor del 30 por ciento en la dieta para salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) se observa una reducción del crecimiento, efecto similar se observa en sunshine bass, debido probablemente a la baja palatabilidad de este insumo (Webster, *et al.*, 2000). El mismo autor señala que diferencias en la composición nutritiva se observan en dichas harinas debido a la distinta procedencia, diferentes métodos de procesamiento, diferencias en la proporción en que se incluyen los constituyentes (hueso, vísceras, carne, sangre, etc.); dichos datos concuerdan con lo concluido por Dong *et al.* (1993), quien encontró diferencias en la composición proximal y en la digestibilidad de la proteína entre muestras de HSA de diferentes manufacturas.

La harina de pluma por su parte contiene alrededor de un 80% de proteína y bajas cantidades de fibra y cenizas, además posee niveles bajos de metionina (NRC, 1993). La producción anual de harina de pluma en EE.UU. llega a 0,364 millones de TM, y su precio alcanza los 280 dólares por TM. (Alimentos Balanceados para Animales, 1999). El CDA de la proteína para trucha arco iris es entre 81 y 87 por ciento (Bureau *et al.*, 2000).

La proteína presente en la harina de pluma proviene de la queratina en un 85-90 por ciento aproximadamente, la que a su vez posee un alto contenido de cisteína (8,8 por ciento de la proteína), por lo tanto, debido a su estructura, este tipo de material debe ser hidrolizado como prerequisite para ser digestible para los animales, ya que en su estado natural posee un bajo valor nutritivo; de esta manera, el grado de hidrólisis es un indicador de la concentración de proteína soluble presente en esta materia prima (Mendoza *et al.* 2001). Este tipo de harina ha sido usada en dietas para trucha arco iris (Satoh *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 2000; Bureau *et al.*, 2000), Carpa (Jahan *et al.*, 2001) y camarón blanco del pacífico (Mendoza *et al.*, 2001).

Bureau *et al.* (2000), señala que al incluir un 20 por ciento de harina de pluma en dietas para trucha arco iris, se aprecia una disminución en el crecimiento y en la eficiencia del alimento, lo que se puede atribuir al déficit de lisina. El mismo autor agrega que la suplementación con lisina mejora parcialmente dichos parámetros.

La harina de carne y hueso posee un 51 por ciento de proteína, siendo deficiente en el contenido de metionina (NRC 1993). Aunque, de acuerdo a Stone *et al.* (2000), los

niveles de proteína pueden aumentar al mezclar harinas de distinto origen, por ejemplo la mezcla de harina de vaca y harina de cordero produce un porcentaje de 60 por ciento de proteína aproximadamente. La producción anual en EE.UU. alcanza los 2,819 millones de TM y su precio varía entre 160 y 180 dólares por TM. (Alimentos Balanceados para Animales, 1999). Alcanza valores de CDA para la proteína cercanos al 85% (Bureau *et al.*, 2000).

A su vez la harina de carne contiene un 55 por ciento de proteína (NRC, 1993). La producción anual en EE.UU. bordea los 0,101 millones de TM, y su precio varía entre 500-550 dólares por TM. (Alimentos Balanceados para Animales, 1999).

La harina de sangre registra valores cercanos al 90 por ciento de proteína (NRC, 1993). El CDA para la proteína es entre 90 y 99 por ciento dependiendo del proceso de secado al que se someta, obteniendo mayores CDA con el secado en spray, en comparación con el secado a vapor (Bureau *et al.*, 2000). Su precio alcanza entre 750 y 800 dólares por tonelada métrica (Aquanoticias, 1998).

2.3.2. Proteínas unicelulares (PUC)

PUC incluye el uso de algas unicelulares y filamentosas, hongos y bacterias en forma seca como reemplazantes de la harina de pescado. Dentro de estas se incluyen PUC de algas (*Spirulina maxima*, *Chlorella spp.*), PUC de hongos (*Candida spp.*, *Saccharomyces*

spp., *Kluyveromyces spp.*, *Phaffia spp.*) y PUC de bacterias (*Methanobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus spp.*) (Tacon, 1994).

2.3.3. Proteínas de origen vegetal

2.3.3.1. Oleaginosas

La conveniencia de productos de soya (*Glycine max*), para reemplazar la harina de pescado ha sido determinada por ser efectiva en costos, sustentable y bajo en fósforo (NRC, 1993). Es la fuente proteica vegetal mas usada en el reemplazo de la harina de pescado (Cheng *et al.*, 2003; Jahan *et al.*, 2001; Sales y Britz, 2003; Refstie *et al.*, 2000; Arndt *et al.*, 1999; Carter y Hauler, 2000; Vielma *et al.*, 2000; Richie y Brown, 1998; Stickney *et al.*, 1996).

Sin embargo las harinas de soya contienen aproximadamente 30 por ciento de extracto no nitrogenado indigestibles (Refstie *et al.*, 2000), además presenta variaciones en el contenido de nutrientes y factores antinutricionales (FAN), es sabido que la soya contiene al menos cinco inhibidores de la tripsina (Adelezi *et al.*, 1988). Para mejorar su valor nutritivo es que la soya debe ser sometida a tratamientos de calor por periodos de tiempo y condiciones de humedad específicas. En el mismo sentido, el procesamiento de la soya para producir harinas, concentrados y aislados mejora sus propiedades nutricionales. Por ejemplo el descascarado aumenta el contenido proteico de la harina de soya de 44,8 por ciento a 50 por ciento, valores muy superiores al 31,2 por ciento que poseen los granos de

soya secados al vapor (NRC, 1993), el concentrado proteico de soya, por su parte alcanza un 62 por ciento de dicho nutriente (Vielma *et al.*, 2000).

Carter y Hauler (2000), señala que el concentrado de soya produce los mejores resultados al reemplazar un 56 por ciento de la proteína presente en la dieta para salmón del atlántico en comparación a soya descascarada y desgrasada, solo desgrasada, y harina de soya sin extracción de lípidos.

El Raps o cánola (*Brassica spp.*) es mayormente una fuente de aceite (40-45 por ciento), pero la harina de raps obtenida después de la extracción del aceite es una interesante fuente de proteína, poseedora de un contenido proteico de entre 32 y 45 por ciento (Burel *et al.*, 2000a). Sin embargo, este tipo de harina contiene altas proporciones de fibra (30–40 por ciento) además otros factores antinutricionales (FAN) como taninas, saponinas y ácido fítico, y glucosinolatos (GLS) (Thiessen *et al.*, 2001), cuyos metabolitos tienen una actividad goitrogénica, es decir, un aumento en el tamaño de la glándula tiroides en todos los animales, incluyendo peces. Por tales motivos, la calidad de la harina de raps ha sido mejorada considerablemente en los últimos años con selección genética de nuevas variedades *Brassica napus* y *Brassica campentris*, sin ácido erúsico y con bajo contenido de GLS (menor de 20–50 $\mu\text{mol/g}$) (Mwachireya *et al.*, 1999). Por otra parte, tratamientos tecnológicos, como descascarado y la utilización de altas temperaturas y solventes orgánicos durante la extracción del aceite, se traducen en una disminución del contenido de GLS, fibra, sinapinas y taninas. (Burel *et al.* 2000b). Satoh *et al.*, (1998) señala que el concentrado proteico de cánola (CPC), y el CPC “desfitinizado” (sin ácido fítico), puede

ser incluido en un 39 por ciento de proteína en la dieta para trucha arco iris. Además Kissil, *et al.* (2000), señala que el reemplazo total de la harina de pescado por CPC en dietas para trucha arco iris, es factible cuando se añade un mejorador de palatabilidad para evitar la disminución del consumo.

Otras harinas de oleaginosas usadas en dietas para la acuicultura son harina de maravilla (*Helianthus annuus*) (Sales y Britz, 2003; Stickney *et al.*, 1996; Sanz *et al.* 1994), harina de maní (*Arachis hypogaea*) (Sales *et al.*, 2003; Richie y Brown, 1999) y harina de algodón (*Gossypium sp.*) (Tacon, 1994; Lee *et al.*, 2002), que poseen concentraciones de proteína de 40,7; 48,1 y 41,2 por ciento respectivamente.

2.3.3.2. Cereales

Los granos de cereales son usados en dietas para peces con el fin de facilitar la aglutinación y expansión (Thodesen y Storebakken, 1998), y además como fuente proteica (Storebackken *et al.*, 2000). El mismo autor señala, que los salmónidos en general, hidrolizan en forma limitada el almidón en el intestino y no regulan eficientemente la concentración de glucosa cuando los niveles de extracto no nitrogenado digestibles son altos.

Los representantes mas usados de este grupo vegetal son gluten de maíz (*Zea mays*), harina de gluten de trigo (*Triticum aestivum*), harina de trigo completo, y menos utilizada

se encuentra la harina de Cebada (*Hordeum vulgare*), con porcentajes de proteína de 81,87; 62,0; 12,89 y 12,9 por ciento respectivamente (Allan *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003).

2.3.3.4. Leguminosas

El contenido proteico de la arveja (*Pisum sativum*), es menor al 25 por ciento (Allan *et al.*, 2000), y es rico en almidón, mayor al 50 por ciento, con un contenido energético relativamente alto. En especies como salmónidos, la utilización digestiva de polisacáridos es limitada, pero con tratamientos de calor, como la extrusión, se produce el quiebre de la estructura del almidón, y así, generalmente se mejora su digestibilidad tanto proteica como energética (Burel *et al.*, 2000a). El descascarado, además, produce una disminución en el contenido de fibra del grano (Davis *et al.*, 2001), aumentando con esto la concentración de proteína cruda de un 25,5 a 27,7 por ciento (Booth *et al.*, 2001). Gracias a la selección genética, hoy en día las variedades de arveja contienen solo bajos niveles de inhibidores de la tripsina y lectinas, los cuales pueden ser posteriormente desactivados con las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de extrusión (Burel *et al.* 2000b). De acuerdo a Fontañas-Fernandez *et al.* (1999), el contenido proteico de la arveja es de 23,9 por ciento.

De acuerdo a resultados obtenidos por Carter y Hauler (2000), el concentrado proteico de arveja, alcanza un 49 por ciento de proteína cruda, y no representa diferencias significativas en ganancia en peso, al sustituir un 25 y 33 por ciento de la harina de pescado en dietas para salmón del atlántico.

Con respecto al lupino existen más de trescientas especies, y solo cinco son cultivadas (Kettel, *et al.*, 2003). Y de estas solo las tres especies son claves comercialmente hablando; *Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus*, y cuyos niveles de proteína cruda varían entre 32,2; 35,8 y 38,3 por ciento, siendo la globulina el mayor componente de la proteína (85 por ciento) (Glencross, 2001). Pero al igual que muchas leguminosas, la proteína del lupino contiene bajas cantidades de amino ácidos sulfurados como metionina y cisteína (Molvig *et al.*, 1997), además en comparación con la soya, el lupino tiende a ser bajo en lisina y triptófano. Sin embargo, este grano es una rica fuente de arginina y contiene un balance de amino ácidos razonablemente bueno con un alto grado de digestibilidad (Sudaryono, 1999b). En adición, el lupino contiene bajas cantidades de almidón, pero es rico en fibra (Kettel, 2003), contenida principalmente en la cáscara, que constituye cerca del 25 por ciento del grano y abarca aproximadamente 90 por ciento de la fibra en la dieta, por lo tanto el descascarar el grano aumenta la concentración de proteína y disminuye el contenido de extracto no nitrogenado (Farangi y Carter, 2001). Sin embargo, este proceso no tiene efecto sobre la α -galactosa, localizada mayoritariamente en los cotiledones, pero los tratamientos de extrusión aumentan la utilización de los componentes del lupino y especialmente, de los extractos no nitrogenados (Burel *et al.* 2000b).

Por otra parte, el desarrollo genético de variedades de lupino “dulce”, se ha traducido en granos con bajos niveles de alcaloides, de entre 130 a 150 mg / Kg (Australia New Zeland Food Authority, 2001).

Otras leguminosas usadas como harina en dietas para la acuicultura son harina de haba (*Vicia faba*), Garbanzo (*Cicer arietinum*) y Alfalfa (*Vicia sativa*), con concentraciones proteicas entre 27,7 y 31,3 por ciento, 21,6 y 24,2 por ciento, 30,9 y 32,3 por ciento; para cada una de las harinas fabricadas de grano entero y grano sin cáscara respectivamente (Booth *et al.* 2001).

2.4. Uso de lupino en dietas para la acuicultura

Son varios los autores (Glencross *et al.*, 2002; 2003; Faranghi y Carter, 2001; Carter y Hauler, 2000; Gouveia *et al.* 1993, Burel *et al.* 2000a; 2000b; 1998; Sudaryono *et al.* 1999a; 1999b; 1999c; 1999d; 1998; Hutabarat, 1999; Robaina, 1998; De la higuera *et al.*, 1988), que señalan al lupino (*L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*) como una buena alternativa proteica de origen vegetal para utilizar en dietas para la acuicultura.

En la experiencia realizada por Gouveia *et al.* (1993), no se encontraron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína y lípidos, y se observó una mejor utilización proteica en dietas que contenían un 20 por ciento de harina de lupino (*L. albus*) para trucha arco iris.

Carter y Hauler, (2000), al sustituir harina de pescado en un 25 por ciento por concentrado proteico de lupino, obtuvo resultados similares que con una dieta control en dietas para salmón del atlántico.

Según Burel *et al.* (1998), los niveles máximos de sustitución de lupino extruido en trucha arco iris se alcanzan entre 50 y 70 por ciento de la harina de pescado, pero es en peces alimentados con dietas que contenía un 30 por ciento de harina de lupino, se observaron los mejores resultados con respecto al peso medio final. Además sugiere la conveniencia de esta materia prima con respecto al crecimiento y disminución en la pérdida de fósforo.

Faranghi y Carter, (2001), determinó que inclusiones de 40 y 50 por ciento de lupino descascarado (*L. albus*), fue ocupado eficientemente por trucha arco iris, sin suplementación extra, y alcanzó la mayor ganancia en peso con una inclusión de 30 por ciento.

Glencross *et al.*, (2002), señala a *L. luteus* como un ingrediente de gran calidad como sustituto a la harina de pescado en dietas para trucha arco iris cultivada en agua de mar, tras sustituir un 50 por ciento de la harina de pescado con harina de dicho insumo y obtener mayor ganancia en peso que con una dieta basada en harina de pescado.

En la experiencia llevada a cabo por Burel *et al.* (2000b), se determinó una digestibilidad de la proteína fue de 96,2 y 97,8 por ciento para lupino extruido (*L. albus*), en trucha arco iris y turbot respectivamente, Burel *et al.* (2000a), no observó diferencias significativas en ganancia en peso con respecto a la dieta control al reemplazar un 30 y 50 por ciento con harina de lupino extruido (*L. albus*).

Con respecto a camarones, Sudaryono *et al.* (1998), indica que *L. angustifolius* es mejor utilizado por *P. monodón* que *L. albus*, y que puede ser incluido en un 40 por ciento aproximadamente en la dieta. Sudaryono *et al.* (1999c), señala que la harina de lupino *L. albus* puede sustituir en un 75 por ciento para dietas de *P. monodón* sin efectos adversos en la mayor parte de los parámetros productivo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la utilización digestiva de dietas con tres niveles de incorporación de harina lupino (*Lupinus albus*) en juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*),

3.2. Objetivos específicos

Evaluar en tres dietas con niveles de incorporación de 20, 30 y 40% de harina de Lupino:

- A) Composición proximal de heces.

- B) Coeficiente de digestibilidad aparente total; proteínas, extracto etéreo y extracto no nitrogenado.

- C) Energía bruta, energía digestible y relación PD/ED.

4. METODOLOGÍA

4.1. Condiciones generales del mantenimiento de los peces

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco. Para el estudio de digestibilidad se utilizaron tanques de fibra de vidrio de forma cilindro cónica de 0.5 m^3 cada uno, con una columna de decantación de heces de acrílico de 0.6 m de largo y 0.09 m de diámetro, esta columna termina con una conexión con hilo para atornillar un tubo de centrifuga de 50 ml (Figura 1 y 2).

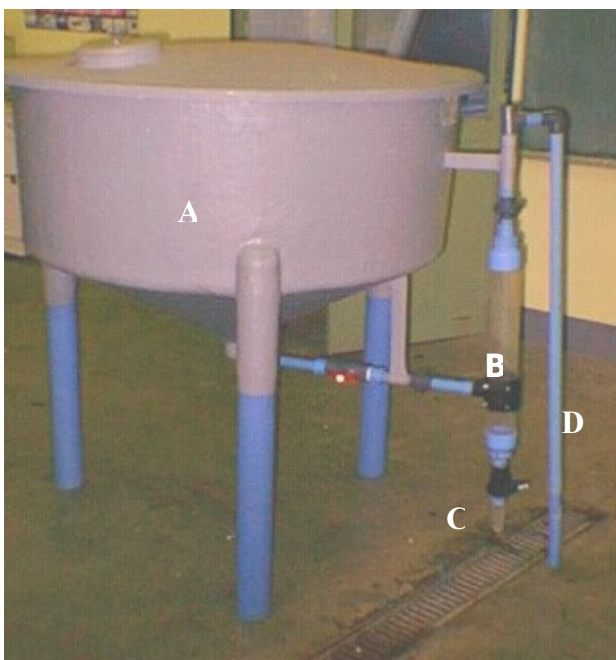


Figura 1. Tanque para bioensayo de digestibilidad.

- A: Tanque contenedor de peces.
- B: Columna de decantación de heces de acrílico.
- C: Tubo de centrifuga de 50 ml para colección de heces.
- D: Tubo efluente de agua.



Figura 2. Detalle Columna de decantación.
A: Tubo de centrifuga de 50 ml para colección de heces.
B: llave de paso para extracción de tubo de centrifuga.

Se trabajó con Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), provenientes de la piscicultura Los Laureles, de la misma universidad. Se utilizaron peces de un peso promedio de $101,2 \pm 1,02$ g los que fueron mantenidos por 10 días en tanques de acondicionamiento para su aclimatación. La circulación del agua se ajustó a una tasa de cambio tal que se lograra una óptima recolección de las heces (0.5/ hora), cuidando que no se produjera una dilución o pérdida de éstas. Cada tanque contó con aireación continua, manteniendo el nivel de oxígeno en 10.02 ± 0.5 mg/l. La temperatura del agua durante la colección de heces osciló entre 13 – 15 °C como promedio.

4.2. Dietas

Las dietas experimentales fueron cuatro, un alimento comercial (Control), y las tres restantes fueron alimento comercial con 20% harina de lupino en reemplazo de la harina de pescado (D1), alimento comercial mas 30% de harina de lupino en reemplazo de la harina de pescado (D2), y alimento comercial mas 40% de harina de lupino en reemplazo de la harina de pescado (D3). En la **Tabla 1** se muestra la composición proximal de las dietas. El alimento fue molido y posteriormente enviado a la Escuela de acuicultura de la Universidad Católica de Temuco por el solicitante del estudio, por tanto se desconoce la formulación de cada una de las dietas. Con el fin de homogenizar el tamaño de las partículas de las dietas, éstas fueron tamizadas a través de una malla con tamaño de orificio de 300 micras. Para evaluar la utilización digestiva del alimento, a un kilogramo de cada dieta se le adicionó un 0.5% de Cr_2O_3 como marcador inerte, este proceso se llevó a cabo mezclando las dietas y el marcador por 40 min. en una mezcladora Kitchenaid modelo K5SS. Luego, esta mezcla

fue humedecida con un 30% de agua para su posterior pelletización en una máquina RCA de 1 HP con una matriz con orificios de 3,5 mm. Los pellets húmedos fueron secados en una estufa durante 36 h a 65°C. Posteriormente las dietas experimentales fueron almacenadas en bolsas y refrigeradas a -20°C.

Tabla 1. Composición proximal (% en base seca) de las dietas experimentales

	Control	D1 (20%)	D2 (30%)	D3 (40%)
Proteína	44,68±0,32 ^a	49,75±0,53 ^b	43,56 ±1,11 ^{a c}	38,90±0,97 ^d
Extracto etéreo	8,65 ± 0,46 ^a	16,31±0,38 ^b	21,47±2,95 ^c	18,42±1,02 ^{b d}
Extracto no nitrogenado*	32,18±0,51 ^a	20,79±0,21 ^b	22,19±3,02 ^{b c}	29,05±0,53 ^d
Fibra	5,30±0,29 ^a	3,34±0,13 ^a	4,02±0,25 ^a	6,36±0,25 ^a
Humedad	7,18±0,17 ^a	10,18±0,08 ^b	8,5±0,16 ^c	10,91±0,22 ^d
Cenizas	8,74±0,09 ^a	9,24±0,23 ^b	8,25±0,04 ^c	6,79±0,14 ^d
% Cr ₂ O ₃	0,55±0,03 ^a	0,64±0,06 ^a	0,61±0,04 ^a	0,51±0,02 ^a

^{a,b,c,d} Valores en la misma fila con distinto superíndices son significativamente diferentes (p<0.05);

Los valores son el promedio con una desviación estándar (n = 3 réplicas).

* Calculados por diferencia (100 - Suma total resto de nutrientes)

4.3. Alimentación y colección de heces

Para coleccionar una cantidad adecuada de heces, en cada tanque se agregaron 15 peces. El bioensayo se realizó durante 20 días, y previo al inicio se aplicó un ayuno de 3 días antes de suministrar cada dieta con el fin de vaciar el tracto digestivo de los peces. Los tratamientos se ensayaron por triplicado, con alimentación manual “*ad libitum*” los siete días de la semana una vez por día. Después de cada alimentación, se abrió la llave del tubo de decantación de los tanques con el fin de eliminar del sistema los residuos de alimento y evitar así la mezcla de muestra con alimento con las futuras heces producidas por los peces.

Después de 24 horas de haber alimentado los peces, se colectaron las heces depositadas en el tubo de centrifuga, este fue dispuesto en una centrifuga (Eppendorf, modelo 5403) durante 15 minutos a 4200 rpm, luego se eliminó el sobrenadante para envasarlas y conservarlas en un freezer hasta obtener las cantidades suficientes para realizar los análisis (70 gr. Aproximadamente).

4.4. Análisis químicos de dietas y heces

Se realizaron análisis proximales y cuantificación de Cr_2O_3 de dietas y heces para determinar la digestibilidad de los principales nutrientes. Todos los análisis fueron realizados en duplicado, para el análisis de las dietas y heces, según las técnicas del método AOAC (1995).

4.4.1. Humedad

La humedad de las muestras se determinó por desecación en estufa a 105°C hasta peso constante. (AOAC, 1995).

$$\% \text{ Materia seca} = \frac{\text{Masa muestra seca} \times 100}{\text{Masa inicial muestra}}$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ Materia seca}$$

4.4.2. Cenizas

El contenido de ceniza según método AOAC (1995), fue determinado mediante calcinación de la muestra en horno mufla a 550°C por tres horas, hasta obtener masa constante.

$$\% \text{ Cenizas totales} = \frac{\text{Masa final}}{\text{Masa inicial}} \times 100$$

4.4.3. Proteínas

El contenido de proteínas (%N x 6.25) se determinó a partir de la composición del nitrógeno total de las muestras, mediante la técnica Kjeldhal. El método consistió en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado a 400°C a la que se adicionó un catalizador. Seguido de una destilación con Na(OH) al 40% en presencia de una solución indicadora con ácido bórico al 4%. Por último se realizó una titulación con HCl 0.1 N. Según método AOAC (1995).

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(\text{Valor ml} - \text{Valor medida patrón ml}) \times 0.1 \times 14.004 \times 6.25 \times 100}{\text{Peso de la muestra (mg)}}$$

4.4.4. Extracto etéreo (E.E.)

El contenido de E.E. de la muestra se determinó mediante el método de extracción en caliente de grasa, con equipo Soxhlet usando éter de petróleo (40 – 60°). (Referencia AOAC 1995).

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{\text{Masa muestra final}}{\text{Masa muestra inicial}} \times 100$$

4.4.5. Fibra

El contenido de fibra de acuerdo al método AOAC (1995), se determinó mediante una digestión ácida de las muestras desgrasadas con H₂SO₄, seguida de una digestión básica con NaOH. A continuación se secó el residuo obtenido en una estufa a 105°C hasta peso constante, se pesó y calcinó a 550°C durante 30 minutos en mufla para pesar al final el residuo restante.

$$\% \text{ Fibra} = \frac{\text{Peso muestra seca } 105^{\circ}\text{C} - \text{Peso muestra calcinada } 550^{\circ}\text{C}}{\text{Peso de la muestra desgrasada}} \times 100$$

4.4.6. Extracto no nitrogenado (E.N.N.)

De acuerdo a lo señalado por AOAC (1995), el contenido de extracto no nitrogenado se determinó por la diferencia de 100 menos la suma de los demás nutrientes.

$$\% \text{ E.N.N.} = 100 - (\% \text{ cenizas} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ E.E.} + \% \text{ Fibra})$$

4.4.7. Determinación de óxido crómico

El porcentaje de óxido de cromo contenido en las muestras de alimento y heces se determinó mediante digestión de las mismas con ácido nítrico, sulfúrico y perclórico concentrados, evaluando en espectrofotómetro a 550 nm. la coloración amarilla obtenida como consecuencia de la solubilización del cromo.

4.5. Parámetros fisiológicos evaluados

4.5.1. Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente total y para nutrientes

Para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) se utilizó un método de determinación indirecto con Cr_2O_3 (0.5%), usado en las dietas como indicador inerte. Los cambios en las proporciones de nutrientes y marcador en el alimento y las heces, permiten el cálculo indirecto de las digestibilidades aparentes de la dieta de referencia o de la dieta experimental (De la Higuera 1988).

$$\text{CDA } (\%)^2 = 100 - \left(100 \times \frac{\text{Nutriente en heces } (\%)}{\text{Nutriente en dieta } (\%)} \times \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta } (\%)}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces } (\%)}\right)$$

$$\text{CDT } (\%)^3 = 100 - \left(100 \times \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta } (\%)}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces } (\%)}\right)$$

4.5.2. Determinación de energía bruta

La energía bruta (EB) de las dietas elaboradas fue determinada mediante el cálculo indirecto del valor calórico aportado por la completa combustión de proteínas, extracto etéreo y extracto no nitrogenado de las dietas que corresponden a 23,6; 39,5y 17,2 kj/g respectivamente (De la Higuera, 1988).

$$\text{EB} = (\% \text{ Proteína} * 23,6) + (\% \text{ Extracto etéreo} * 39,5) + (\% \text{ extracto no nitrogenado} * 17,2)$$

4.5.3. Determinación de energía digestible

De acuerdo a De la Higuera (1988), en el cálculo de energía digestible del alimento se utilizaron los valores de digestibilidad del alimento, la composición proximal del alimento y los valores calóricos estándar de cada macro nutriente.

$$\text{ED} = (\text{g proteína cruda} \times \% \text{ digestibilidad} \times 23.6 \text{ kj/g}) + (\text{g E.E.} \times \% \text{ digestibilidad} \times 39.5 \text{ kj/g}) + (\text{g E.N.N.} \times \% \text{ digestibilidad} \times 17.2 \text{ kj/g}).$$

² Coeficiente de digestibilidad aparente

³ Coeficiente de digestibilidad total

4.5.4. Relación proteína digestible y energía digestible

Para indicar los gramos de proteína digerida por Mj de energía del alimento, se utilizaron los valores de digestibilidad de las proteínas y la energía digestible de cada dieta (De la Higuera, 1988).

PD/ED = g proteína digestible / Energía digestible (Mj).

4.6. Tratamientos estadísticos

Los datos obtenidos de la experimentación con las dietas (porcentajes de digestibilidad aparente total y para cada nutriente, análisis proximales y evaluación energética de las dietas) fueron comparados a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre medias se compararon por el test de Tukey con un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0.05$). Previo a la aplicación de la anova se verificó la homogeneidad de varianza. Y se hizo la transformación arco coseno, donde $f(x) = \text{Cos}^{-1} \sqrt{1-x}$ descrita por Sokal y Rohlf (1969) para los datos en porcentaje.

Para los diferentes cálculos respecto a la verificación de homogeneidad de varianzas y test de Tukey, fue utilizado el programa computacional Statmost 3.0.

5. RESULTADOS

5.1. Composición proximal de las heces

En la **tabla 2** se muestra la composición proximal de las heces. El análisis de la varianza y la comparación de medias reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) entre proteínas, extracto etéreo, ENN y cenizas para las cuatro dietas testadas. Solamente el porcentaje de fibra, no presento diferencias ($p > 0,05$), entre la dieta Control, D1 y D2, pero sí con la dieta D3.

Tabla 2. Composición proximal de las heces colectadas en las pruebas de digestibilidad

	Control	D1 (20%)	D2 (30%)	D3 (40%)
Proteínas	15,10±1,25 ^a	13,04 ± 0,63 ^b	11,16 ± 0,57 ^c	9,36 ± 0,14 ^d
Extracto etéreo	2,04±0,19 ^a	2,62 ± 0,31 ^b	3,94 ± 0,18 ^c	8,83 ± 0,12 ^d
Extracto no nitrogenado *	46,25 ± 1,71 ^a	26,79 ± 4,50 ^b	36,95 ± 1,18 ^c	31,56 ± 1,22 ^d
Fibra	15,04± 1,77 ^a	17,01 ± 0,97 ^b	16,35 ± 0,34 ^{abc}	23,12 ± 0,38 ^d
Cenizas	19,80±1,00 ^a	38,04±2,90 ^b	29,24±0,39 ^c	24,22±0,37 ^d
Cr ₂ O ₃	1,46±0,37 ^a	3,95±0,12 ^{bcd}	3,49±0,24 ^{bcd}	3,51±0,23 ^{bcd}

^{a,b,c,d} Valores en la misma fila con distinto superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$);

Los valores son el promedio con una desviación estándar (n = 3 réplicas).

* Calculados por diferencia (100- Suma total resto de ingredientes).

5.2. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDAs)

En la **Tabla 3** se muestran los coeficientes de digestibilidad aparente total y de los nutrientes para las cuatro dietas experimentales. Al comparar, mediante ANOVA las digestibilidades aparentes totales para las cuatro dietas, se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas. El test de comparación de medias reveló que las diferencias están entre la dieta Control (66,86%) y las dietas con lupino; presentando estas últimas digestibilidades totales más elevadas, que variaron entre 82,49% (dieta D2) y 85,41% (dieta D3). La dieta D1 (83,77%) no fue significativamente diferente a las otras dos dietas con lupino, sin embargo si hubo diferencias entre la dieta D2 (82,49%) y D3 (85,41%).

El análisis de la varianza para valores de CDAs, de proteínas, extracto etéreo y ENN presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. A continuación se describe los resultados del análisis de comparación de medias a través de test de Tukey:

- El CDA de las proteínas de la dieta Control (88,92%), fue significativamente menor ($p < 0,05$), al alcanzado con las dietas que contenían harina de lupino, con una digestibilidad promedio de 95,92%. Los CDAs de proteínas de la dieta D1 (95,47%) y D2 (95,78%) no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellas, pero sí estas dos, con la dieta D3 (96,51%).

- El valor promedio de los CDAs del extracto etéreo en las dietas con harina de lupino fue más elevado que el de la dieta Control, alcanzando valores sobre el 94 por ciento. El CDA de la dieta Control fue de 92,80%, significativamente diferente ($p < 0,05$) de las dietas D1 (97,64%) y D2(97,05%), pero no así de la dieta D3(94,27%).
- Las dietas que incluían harina de lupino presentaron digestibilidades más altas que la dieta Control para el caso de E.N.N. La digestibilidad más baja se encontró en la dieta Control (49,65%), seguida de la dieta D2 (61,98%) y las digestibilidades más altas se obtuvieron con las dietas D1 y D3 las que no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$).

Tabla 3. Coeficientes de digestibilidad aparente de las dietas experimentales.

	Control	D1 (20%)	D2 (30%)	D3 (40%)
CDA Total	66,86 ± 1,89 ^a	83,77 ± 0,48 ^b	82,49 ± 1,19 ^{b c}	85,41 ± 0,99 ^{b d}
CDA Proteínas	88,92 ± 0,44 ^a	95,47 ± 0,16 ^b	95,78 ± 0,50 ^{b c}	96,51 ± 0,22 ^d
CDA Extracto etéreo	92,80 ± 1,07 ^a	97,64 ± 0,24 ^b	97,05 ± 0,33 ^{b c}	94,27 ± 0,40 ^{ad}
CDA Extracto no nitrogenado	49,65 ± 1,10 ^a	80,56 ± 2,88 ^b	61,98 ± 1,60 ^c	81,68 ± 0,79 ^b

^{a,b,c,d} Valores en la misma fila con distinto superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$); ns: no significativas. Los valores son el promedio con una desviación estándar (n = 3 réplicas).

5.3. Evaluación energética de las dietas

La energía digestible (**Tabla 4**) fue significativamente más alta ($p < 0,05$) en las dietas con harina de Lupino. La relación proteína digestible v/s energía digestible (PD/ED) presenta significativas diferencias entre todos los tratamientos ($p < 0,05$), obteniéndose la

relación más alta en la dieta Control con 25,58 g/Mj., mientras que la relación más baja se logra en la dieta D3 con 18,96 g/Mj. (**Tabla 4**).

Tabla 4. Energía bruta, Energía digestible y relación proteína digestible v/s energía digestible

	Control	D1 (20%)	D2 (30%)	D3 (40%)
Ea. Bruta (MJ/kg)	19,50	21,76	22,58	21,45
ED (Mj/Kg)	4,62 ± 2,22 ^a	10,08 ± 0,71 ^b	8,77 ± 1,33 ^{b c}	12,24 ± 0,20 ^{b d}
PD/ED (g/MJ)	25,58 ± 0,18 ^a	23,30 ± 0,12 ^b	20,41 ± 0,04 ^c	18,96 ± 0,04 ^d

^{a,b,c,d} Valores en la misma fila con distinto superíndices son significativamente diferentes (p<0.05); ns: no significativas. Los valores son el promedio con una desviación estándar (n = 3 réplicas).

Con respecto a la Energía bruta, el valor más bajo lo presenta la dieta Control con 19,50 MJ/Kg. y la mas alta en la dieta D2 con 22,58 MJ/Kg.

6. DISCUSIÓN

Los resultados arrojados por los análisis proximales realizados a los alimentos, evidencian significativas diferencias ($p < 0,05$), entre los distintos nutrientes presentes en las dietas experimentales, por ejemplo los resultados variaron entre 38,90% y 49,75% para el caso de las proteínas y entre 8,65% y 21,47% en el caso del extracto etéreo (Tabla 1). Tal situación contrasta con lo señalado por numerosos autores (Gouveia y Davis, 2000; Storebakken *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2000; Stickney *et al.*, 1996; Vielma *et al.*, 2000; Bureau *et al.*, 2000; Refstie *et al.*, 2000; Richie y Brown, 1999; Kissil *et al.*, 2000) quienes describen dietas experimentales formuladas para contener proporciones similares del o los nutrientes a evaluar. Tales diferencias antes mencionadas, se producen por una parte, debido a la formulación de la dieta Control (Tabla 1), la cual no cumple con los requerimientos mínimos de extracto etéreo (entre 15 – 23 por ciento), y además, posee un alto contenido de extracto no nitrogenado (32,18 por ciento), evidentemente mayor al 10 – 20 por ciento sugerido como límite máximo de inclusión en la dieta para salmonídeos (Heen, *et al.*, 1993). Por otra parte, la incorporación de los distintos niveles de lupino, se tradujo en desigualdades significativas ($p < 0,05$) para todos los nutrientes con excepción de fibra entre las dietas. Sin embargo las diferencias en la concentración de los distintos nutrientes en las dietas no se reflejaron en los valores obtenidos para energía bruta, ya que si bien la inclusión de harina de lupino en las dietas se tradujo en un aumento del porcentaje de extracto etéreo y en una baja porcentual del extracto no nitrogenado en las dietas experimentales (Tabla 1), finalmente se mantuvo una proporción similar a la dieta Control al momento de calcular la energía bruta (tabla 4).

El valor de CDA total de este estudio para la dieta Control (66,86%), es bajo con relación a los resultados obtenidos por Mwachireya *et al.* (1999) y Cheng *et al.* (2002), quienes determinaron 80,7 % y 81,3% respectivamente en trucha arco iris, los valores obtenidos en el presente bioensayo son igualmente inferiores con respecto al 82,75% y 89,4%, obtenidos por Carter y Hauler (2000) en *S. salar* y por Allan *et al.* (1997) en perca dorada. En adición, Burel *et al.* (1998), señala 77,6 % de digestibilidad total para una dieta control trabajando con trucha arco iris.

Los resultados conseguidos para CDAs total de las dietas con 20% de sustitución con harina de lupino alcanzados en el presente bioensayo (83,77%), son altos en comparación a lo informado por Gouveia *et al.* (1993), quien describe valores de entre 74,70% y 75,84% tras incorporar 22,2 por ciento de harina de lupino (*L. albus*) y la misma harina sometida a calor / expansión respectivamente. En adición, Sudaryono *et al.* (1999c), señala 76,2% al incluir 25% de *L. albus* en dietas para *Penaeus monodon*. Valores levemente superiores (84,36%), fueron determinados por Carter y Hauler (2000), tras agregar 25% de concentrado proteico de *L. angustifolius* en dietas para salmón del atlántico, debido a que los concentrados proteicos mejoran la digestibilidad de los ingredientes.

Por otra parte, la inclusión de 30% de *L. albus* extruido, realizada por Burel *et al.* (1999), se tradujo en CDAs totales de 69,7% para trucha arco iris y 80,5% para el caso de turbot, siendo este último relativamente cercano al obtenido en el presente trabajo (82,49%), para idéntico nivel de sustitución. Carter y Hauler (2000), obtuvieron un valor

más elevado (85,5%) luego de evaluar dietas formuladas con un 33% de concentrado proteico de lupino (*L. angustifolius*) en dietas para *S. salar*. Allan *et al.* (2000), observó CDA total igualmente bajos (66,8% y 52,4%) para *L. albus* y *L. angustifolius* respectivamente, tras reemplazar un 30% de la dieta para perca plateada.

El valor de CDA total obtenido en la dieta con un 40% de sustitución con harina de lupino en el presente estudio (84,41%), es igualmente elevado en contraste con lo señalado por Morales *et al.* (1994) quien encontró un 53,1% al evaluar en trucha arco iris una dieta formulada con 43% de lupino entero.

La incorporación de lupino en las dietas, sin lugar a dudas elevó la calidad de la dieta Control tanto en términos de requerimientos nutritivos de la especie, ya que de acuerdo a los análisis proximales realizados a las dietas (Tabla 1), las dietas con sustitución parcial de harina de lupino, se encuentran dentro de los rangos nutritivos adecuados para esta especie.

El CDA de las proteínas para la dieta Control de 88,92%, se encuentra dentro de un rango normal para los alimentos formulados basándose en harina de pescado de acuerdo a variados autores: 83,65% (Morales *et al.*, 1994), 89,2% (Burel *et al.*, 2000b), 86,15% (Gouviea *et al.*, 1993), 88,9% (Burel *et al.*, 1998), 92,3% (Allan, 1997), todas en trucha arco iris.

El valor obtenido en esta experiencia para CDA de proteína por la dietas que contenía harina de lupino en un 20% (95,47%), se enmarca dentro del mismo rango (94,55%) alcanzado por Robaina (1998), para igual nivel de sustitución de lupino blanco en *Sparus aurata*, y por Carter y Hauler (2000) (95,65%), en dietas con 25% de concentrado de proteína de *L. angustifolius* para salmón del atlántico. Sin embargo es elevado al compararlo con 90,03% y 87,35%, registrados con dietas para trucha arco iris con un 22,2% de harina de lupino blanco con y sin previo proceso de extrusión respectivamente (Gouveia *et al.* 1993), y al 90,7% determinado por Sudaryono *et al.* (1999c) quienes incluyeron 25% de harina de lupino en dietas para *P. monodon*. Resulta además, ampliamente elevado en contraste al 81,9% para *L. albus* crudo y 73,0% tratado con calor en trucha arco iris (De la Higuera *et al.* 1988).

El CDA para proteína obtenido por Burel *et al.* (2000b) de 96,2% para trucha arco iris y 97,8% en turbot, al incorporar 30% de lupino blanco extruido en la dieta, son ligeramente mayores a los determinados en el presente estudio (95,78%). La misma tendencia se aprecia en perca plateada (79,1%) alimentada con *L. angustifolius* extruido presente en la dieta en similares proporciones (Allan *et al.* 1999). Sin embargo, los resultados de este trabajo, concuerdan con lo señalado por Carter y Hauler (2000) (95,90%) al trabajar con *L. angustifolius* presente en un 33% de la dieta para *S. salar* y 95,9% para perca plateada alimentadas con dietas con 30% de harina de lupino blanco. Por el contrario, Robaina (1998), obtuvo 92,96% de CDA para la proteína al incorporar harina de lupino *Lupinus albus* en dietas para dorada, en la proporción antes mencionada.

Cuando se evaluó la inclusión de 40% de Harina de lupino en el presente bioensayo, se pudo apreciar valores altos para CDA la proteína (96,51%), comparando con el 81,2% obtenido por Morales *et al* 1994 y el 81,8% y 81,0% señalado por De la Higuera (1988) para lupino blanco crudo y sometido a calor respectivamente, ambos trabajos para 40% de sustitución y realizados con trucha arco iris.

El CDA para la proteína en este trabajo, fue significativamente mayor ($p < 0.05$), en todas las dietas con inclusión de harina de lupino (Tabla 3), con relación a la dieta Control, esta tendencia puede explicarse por el mayor porcentaje de ENN presente en la dieta Control (Tabla 1), con respecto a las dietas con harina de lupino, lo que concuerda con NRC (1993), que señala que la digestibilidad de la proteína tiende a disminuir cuando la concentración de extracto no nitrogenado aumenta en la dieta.

El resultado para el CDA del extracto etéreo en la dieta Control de este trabajo (92,80%) es levemente menor al 94,66 por ciento obtenido por Gouveia *et al.* (1993), en trucha arco iris.

El CDA para el extracto etéreo obtenido en el presente trabajo para la dieta con 20 por ciento de inclusión de lupino (97,64) es alto al compararlo con los resultados indicados por Robaina (1998) de 93,95% para dorada y por Gouveia *et al.* (1993) con 94,38% y 95,95% para trucha arco iris, ambos trabajos utilizando lupino blanco. El 97,05 por ciento de CDA para lípido se obtuvo al evaluar 30 por ciento de sustitución en la dieta en este

bioensayo, un valor alto comparado al 95,35 por ciento señalado por Robaina (1998) para dorada. Morales *et al.* (1994) obtuvieron un 88,7 por ciento de CDA para lípido en dietas con un 40% de lupino crudo, valor ampliamente menor al 94,27 por ciento alcanzado en este trabajo.

La digestibilidad para el extracto etéreo de las dietas con reemplazo de lupino fue significativamente ($p < 0.05$) superior a la alcanzada por la dieta Control, posiblemente por la diferencia en la composición de ácidos grasos entre las harinas utilizadas. La mayoría de los ácidos grasos de la harina de pescado son saturados (51.4%), mientras que en las harinas de lupino estos sólo se encuentran en un 13 – 15%. De acuerdo a Robaina (1998), las grasas saturadas con puntos de fusión elevados son menos digestibles para los peces que las poliinsaturadas.

De acuerdo a Wilson (1994), el CDA del extracto no nitrogenado, para dietas en las que dicho nutriente se encuentra presente en un 20%, es aproximadamente 77,2%, y además, los valores de digestibilidad para éste nutriente varían en forma inversa al nivel de inclusión. En el presente estudio, no se apreció dicha tendencia, ya que si bien es cierto las dietas que presentaron niveles cercanos al 20% de Extracto no nitrogenado (tabla 1) en la dieta son D1 (20,79%) y D2 (22,19%) se tradujeron en digestibilidades de 80,56% y 61,98% respectivamente, siendo significativamente ($p < 0.05$) menor el CDA al subir el nivel de inclusión; para el caso de la dieta D3 con 29,05% de extracto no nitrogenado la digestibilidad fue de 81,68%.

Finalmente, se puede apreciar que las dietas con harina de lupino poseen menores valores para la relación proteína digestible v/s energía digestible (Tabla 4), en contraste a la dieta Control, en este sentido Cho y Bureau (2001) indican que numerosos estudios han demostrado que al reducir la relación PD/ED en alimento para peces, a través del aumento en el contenido de energía no proteica en la dieta, se traduce en una mayor eficiencia en la retención de nitrógeno, decreciendo en consecuencia la excreción de nitrógeno disuelto.

7. CONCLUSIONES

1. Las tres dietas con inclusión de harina de lupino presentaron mayores valores de coeficiente de digestibilidad aparente total y para nutrientes con respecto a la dieta Control.
2. La inclusión de harina de lupino en las dietas experimentales conllevó a una mayor energía digestible y una menor relación PD/ED. Sin embargo no produjo mayores efectos sobre la energía bruta.
3. La dieta Control, fue evidentemente mejorada en términos de requerimientos nutritivos de la especie en que fue evaluada (*Oncorhynchus mykiss*), tras la incorporación de los distintos niveles de harina de lupino.
4. La Dieta D3 (40%), obtuvo los mejores resultados con respecto a coeficiente de digestibilidad total, proteína y extracto no nitrogenado, Además presento los mejores valores de Energía digestible y relación PD/ED.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Warith, A., Russell, P., and Davies, S. 2001. Inclusion of a commercial poultry by-product meal as a protein replacement of fish meal in practical diets for African catfish *Clarias gariepinus*. (Burchell 1822). *Aquaculture Research*. 32:296-305.

Adelizi, P., Rosati, R., Warner, K., Wu, Y., Muench, T., White, M., and Brown, P. 1998. Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition* 4: 255-262.

Allan, G. 1997. Potential for pulses in aquaculture systems. NSW fisheries. Australia. (7 pp).

Allan, G., Parkinson, S., Booth, M., Stone, D., Rowland, S., Frances, J., and Warner-Smith, R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients, *Aquaculture* 186:293-310.

Alimentos Balanceados para Animales. 1999. Comparación de proteínas vegetales en alimentos acuáticos. 6: 33-35.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. 16th Edition. AOAC: Washington, DC. 1018 pp.

Aquanoticias Internacional. 1997. Alimento para peces: se ajusta el mercado. 8: 7-24.

Aquanoticias Internacional. 1988. En busca del equilibrio perfecto. 12: 5–15.

Arndt, Ronney., Hardy, R., Sugiura, S., and Dong, F. 1999. Effects of heat treatment and substitution level on palatability and nutritional value of soy defatted flour in feeds for Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 180 129-145.

Australia New Zealand Food Authority. 2001. Lupin alkaloids in food - a toxicological review and risk assessment. (21 pp).

Austreng, E., Storebakken, T., Thomassen, M., Refstie, S., and Thomassen Y. 2000. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture* 188:65-78.

Barlow, S. 2001. Fishmeal and oil – supplies and markets. Presentation to Ground Fish Forum.

Booth, M., Allan, G., Frances, J., and Parkinson, S. 2001. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus* IV. Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. *Aquaculture* 196:67-85.

Bórquez, A., y Alarcón., P. 2002. Reemplazo parcial de harina de pescado por harina de lupino en dietas para salmón del atlántico. *Salmonicultura* 28: (3 pp).

Bureau, D., and Cho, C. 1999. Measuring digestibility in fish. *Fish Nutrition Research Laboratory*. 6pp.

Bureau, D., Harris, A., Bevan, D., Simmons, L., Azevedo, P., and Cho, C. 2000. Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture* 181:281-291.

Burel, C., Boujard, T., Corraze, G., Kaushik, S., Boeuf, G., Mol, K., Van Der Geyten, S., and Kühn, E. 1988. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture* 163: 325-345.

Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K., Kühn, E., Quinsac, A., Krouti, M., and Ribaillier, D. 2000a. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 188:363-382.

Burel, C., Boujard, T., Tulli F., and Kaushik, S. 2000b. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*), *Aquaculture* 188:285-298.

Carter, C., and Hauler, R. 2000. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185:299-311.

Cheng, Z., and Hardy, R. 2000. Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat middlings, measured in vivo using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 8: 271-277.

Cheng, Z., and Hardy, R. 2002. Apparent digestibility coefficients of nutrients and nutritional value of poultry by-product meals for Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* measured in vivo using settlement. *Journal of the world aquaculture society* 33: 459:465.

Cheng, Z., and Hardy, R. 2003. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 9: 77-83.

Cho, C., and Bureau, D. 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research* 32: 349-360.

Cho, C., Cowey, C., and Watanabe, T. 1985. *Finfish Nutrition in Asia. Methodological approaches to research and development.* International Development Research Centre, Ottawa.

Davis, D., Arnold, C., and Mccallum, I. 2001. Nutritional value of feed peas (*pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 8:87-94.

De la Higuera M. 1988a. Requerimientos de proteína y aminoácidos en peces. CAICYT. *Nutrición en acuicultura II*. España.

De la Higuera, M., García-Gallego, M., Sanz, A., Cardenote, G., Suárez, M., and Moyano, F. 1988b. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 71: 37-50.

Dong, F., Hardy, R., Haard, N., Barroes, F., Rasco, B., Fairgrieve, W., and Forster, I. 1993. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture* 166: 149-158.

El-Sayed, A. 1999. Alternative dietary protein source for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* 179: 149-168.

Erfanullah, and Jafri, A. 1998. Evaluation of digestibility coefficients of some carbohydrate-rich feedstuffs for indian major carp fingerlings. *Aquaculture Research*. 29:511-519.

Faranghi, M., and Carter, C. 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Research* 32:329-340.

Fauconneau, B. 1988. Partial substitution of protein by a single amino acid or an organic acid in rainbow trout diets. *Aquaculture*. 6:97 – 106.

Fontáinhas-Fernandez, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M., and Coimbra, J. 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquac.* 7: 57-67.

Forster, I. 1999. A note on the method of calculating digestibility coefficients of nutrients provided by single ingredients to feeds of aquatic animals. *Aquaculture Nutrition* 5: 143-145.

Gill, C. 2001. Productos de proteínas animales y marinas con marcas registradas. *Alim. Balanc. anms.* 8:14 – 16.

Glencross, B. 2001. Feeding lupins to fish. A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Department of Fisheries Research Division Government of Western Australia. (126 pp).

Glencross, B., Curnow, J., Hawkins, W., and Felsing, M. 2002. Evaluation of yellow lupin *Lupinus luteus* meal as an alternative protein resource in diets for sea-cage reared Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the world aquaculture society 33: 287:295.

Glencross, B., Curnow, J., Hawkins, W., Kissil, G., and Peterson, D. 2003. Evaluation of the feed value of a transgenic strain of the narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) in the diet of the marine fish, *Pagrus auratus*. Aquaculture Nutrition 9: 197-206.

Gouveia, A., and Davies, S. 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 182: 183-193.

Gouveia, A., Teles, O., Gomes, E., and Rema, P. 1993. Effect of cooking/expansion of three legume seeds on growth and food utilization by Rainbow trout. Fish nutrition in practice. Ed. INRA, Paris 61: 933 – 938.

Hardy, R. 1997. Understanding and using apparent digestibility coefficients in fish nutrition. Aquaculture Magazine May/June 84:89.

Hardy, R., 2000. New developments in aquatics feed ingredients, and potential of enzyme supplements and potential of enzyme supplements. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Yucatán Mexico.

Heen, K., Monahan, R., and Utter, F. 1993. Salmon aquaculture. John Wiley & Sons, INC. New York. (278 pp.).

Hutabarat, J. 1999. The combination of fish meal, soybean meals and dehulled lupin in fish feed and their effects on the growth of red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Coastal Development (11 pp).

Iffo (International Fishmeal and fish oil organization). 2001. Sustainability of fish meal and oil supply. Paper presented at Scottish-Norwegian Conference on Sustainable Futures for Marine Fish Farming.

Jahan, P., Watanabe, T., Satoh, S., and Kiron, V. 2001. Formulation of low phosphorus loading diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) Aquaculture Research. 32:361-368.

Kettel, K., Tuck, B., Payne, W., Cheng, C., Machado, S., and Karow, R. 2003. Dryland Cropping Systems. (11pp).

Kissil, G., Lupatsch, I., Higgs, D., and Hardy, R. 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquaculture Research. 31:595-601.

Lee, K., Dabrowski, K., Blom, J., Bai, S., and Stromberg, P. 2002. A mixture of cottonseed meal, soybean meal and animal byproduct mixture as a fish meal substitute: growth and

tissue gossypol enantiomer in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition*. 86 (13p).

Mendoza, R., De Rios, A., Vazquez, C., Cruz, E., Ricque, D., and Aguilera, C. 2001. Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition* 7:143-151.

Molvig, L., Tabe, L., Eggum, B., Moore, A., Craig, S., Spencer, D., and Higgins, T. 1997. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed Abumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 8393-8398.

Morales, A., Cardenete, G., De la Higuera, M., and Sanz, A. 1994. Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124: 117 – 126.

Mwachireya, S., Beames, R., Hinggs, D., and Dosanjh, B. 1999. Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water. *Aquaculture Research* 5:73-82.

National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requirements of fish. National Academy Press. Washington, DC, USA.

Regost, C.; Arzel, J. and Kaushik, S. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diets for turbot (*psetta maxima*). Aquaculture. 180. 99:117.

Refstie, S., Korsoen, O., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., and Roem, A. 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 190:49-63.

Richie, M., and Brown, P. 1999. Incorporation of plant protein feedstuffs into fish meal diets for rainbow trout increases phosphorus availability. Aquaculture Nutrition 5: 101-105.

Robaina, L. 1998. Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*) Informes Técnicos. Instituto Canario de Ciencias Marinas (195 pp).

Sales, J., and Britz, P. 2003. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for South African abalone (*Haliotis midae* L.). Aquaculture Nutrition 9: 55-64.

Sanz, A., Morales, A., and de la Higuera, M., and Cardenote, G. 1994. Sunflower meal compared with soybean meal as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: protein and energy utilization. *Aquac.* 128. 287:300.

Satoh, S., Higgs, D., Dosanjh, B., Hardy, R., Eales, J., and Deacon, G. 1998. Effect of extrusion processing on the nutritive value of canola meal for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater. *Aquaculture Nutrition* 4: 115-122.

Satoh, S., Takanezawa, M., Akimoto, A., Kitron, V., and Watanabe, T. 2002. Changes of phosphorus absorption from several feed ingredients in rainbow trout during growing stages and effect of extrusion of soybean meal. *Fisheries Science* 68:325-331.

Sokal, R., and Rohlf, F. 1969. *Biometría*. Volumen 1. Ediciones H. Blume. (403 pp).

Sorensen, M., Ljokjel, K Storebakken, T., Shearer, K., and Skrede, A. 2002. Apparent digestibility of protein, amino acids and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fish meal based diet extruded at different temperatures. *Aquaculture* 211: 215-225.

Stickney, R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. Texas Sea Grant College Program. Bryan, Texas.

Stickney, R., Hardy, R., Koch, K., Harrold, R., Seawright, D., and Masee, K. 1996. The effects of substituting selected oilseed protein concentrate for fish meal in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* diets. *Journal of the world aquaculture society* 27: 57:63.

Stone, A., Allan, G., Parkinson, S., and Rowland, S. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus Bisyanus* III. Digestibility and growth using meat meal products. *Aquaculture* 186: 311-326.

Storebakken, T., and Austreng, E. 1987. Binders in fish feed II. Effect of different Alginates on the digestibility of macronutrients in Rainbow Trout. *Aquaculture* 60: 121-131.

Storebakken, T., Shearer, K., Baeverfjord, G., Nielsen, B., Asgard, T., Scott, T., and De Laporte, A. 2000. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture* 184:115-132.

Sudaryono, A.1999a. Influence of different legume meals inclusion on diets digestibility in juvenile *Penaeus monodon* (Fabricius). *Journal of Coastal Development* (7 pp).

Sudaryono, A.1999b. Lupin meal utilization in aquaculture feeds. *Journal of Coastal Development*. (8 pp).

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., and Evans, L. 1999c. Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquaculture Nutrition*. 5: 277-285.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., and Evans, L. 1999d. Replacement of soybean meal by lupin meal in practical diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Journal of the world aquaculture society* 30: 46-57.

Sudaryono, A., Tsvetnenko, E., Hutabarat, J., Supriharyono, and Evans, L. 1998. Lupin ingredients in shrimp (*penaeus monodon*) diets: influence of lupin species and types of meals. *Aquaculture* 171: 121-133.

Sugiura, S., Kabbitt, J., Dong, F., and Hardy, R. 2000. Utilization of fish and animal by-product meals in low-pollution feeds for Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 31:585-593.

Tacon, A. 2003. Acuicultura sustentable en américa latina y en caribe: un sueño o una realidad. I Simposio Internacional de Acuicultura. Acuacuba 12-15 de septiembre. Ciudad de la Habana, Cuba.

Tacon, A. 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fish meal and other fishery resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (35 pp).

Thiessen, D., Campbell, G., and Adelizi, P. 2001. Digestibility and growth performance of juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition* 9: 67-75.

Thodesen, J., and Storebakken, T. 1998. Digestibility of diets with precooked rye or wheat by atlantic salmon, *Salmo salar*, L. *Aquaculture Nutrition* 4: 123-126.

Vandenberg, G., and De la noüe, J. 2001. Apparent digestibility comparison in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquaculture Nutrition* 7: 237-245.

Vielma, J., Makinen, T., Ekholm, P., and Koskela, J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183:349-362.

Watanabe, T. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries science*. 68; 242-252.

Webster, C., Thompson, K., Morgan, A., Grisby, E., and Gannam, A. 2000. Use of hempseed meal, poultry by-product meal, and canola meal in practical diets without fish meal for sunshine bass (*Morene chrysops* X *M. Saxatilis*). *Aquaculture* 188: 299-309.

Weatherup, R., and McCracken, K. 1998. Comparison of estimates of digestibility of two diets for Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), using two markers and two methods of faeces collection. *Aquaculture Research*. 29:527-533.

Wilson, R. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*. 124: 67-80.

Windsor, M. y Barlow, S. 1984. Introducción a los subproductos de pesquería. España.

Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Suzuki, N., and Shiraishi, M. 2001. Nutrient digestibility values of a test diet determined by manual feeding and self-feeding in Rainbow Trout and common carp. *Fisheries Science*. 67:335-357.

Zhu, S., Chen, S., Hardy, R., and Barrows, F. 2001. Digestibility, growth and excretion response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to feeds different ingredient particle sizes. *Aquaculture Research*. 32:885-893.