



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EVALUACIÓN DE INGREDIENTES VEGETALES Y ANIMALES PARA EL REEMPLAZO DE HARINA DE PESCADO Y SU EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEASAS ALCALINAS EN PECES

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

EMMANUEL VILLANUEVA GUTIÉRREZ

Hermosillo, Sonora, México

Diciembre de 2021

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

EVALUACIÓN DE INGREDIENTES VEGETALES Y ANIMALES PARA EL
REEMPLAZO DE HARINA DE PESCADO Y SU EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA Y EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEASAS ALCALINAS EN PECES

TESIS

que para obtener el grado de:

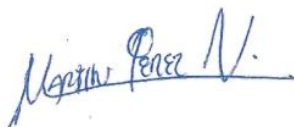
DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

EMMANUEL VILLANUEVA GUTIÉRREZ

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Evaluación de ingredientes vegetales y animales para el reemplazo de harina de pescado y su efecto sobre la actividad enzimática y expresión génica de proteasas alcalinas en peces”, presentada por Emmanuel Villanueva Gutiérrez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. Martín Pérez Velázquez
Director



Dra. Mayra Lizett González Félix
Co-Directora y Secretario



Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro
Sinodal



Dr. Enrique de la Re Vega
Sinodal



Dr. Armando García Ortega
Sinodal Externo

DEDICATORIA

A mi esposa Ana Lucía gracias por la ayuda que me has brindado ha sido muy importante, estuviste a mi lado en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, siempre fuiste muy motivadora y esperanzadora, me decías que lo lograría perfectamente.

Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso.

Sé que este agradecimiento no hace justicia a todo lo que has hecho, tu preocupación, tu amor, tu paciencia y tu sacrificio no tiene nombre.

Te agradezco de la manera más sincera e infinitamente por estar a mi lado en todo momento y por compartir nuevos e inolvidables momentos en nuestras vidas.

Muchas gracias, amor.

Arys y Lucky ♥

Con todo mi cariño y amor a mi familia Nora L., Enrique & Norita
quienes han sido pilar fundamental
que han hecho todo en la vida para que pueda lograr mis metas,
a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento.

V. M. S. F. W.

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindar de su apoyo para la realización de este trabajo.
- Al posgrado en Biociencias de la Universidad de Sonora, por darme la oportunidad de estudiar el doctorado.
- Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS), por participar en mi formación y constante apoyo durante mi etapa profesional e intelectual.
- A la Unidad Experimental Kino (UEK) del DICTUS, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.
- A todo el personal de la UEK por su amistad y apoyo otorgado, durante el desarrollo de la fase experimental del presente estudio.
- Al Dr. Martín Pérez Velázquez y a la Dra. Mayra Lizett González Félix por su ayuda, apoyo y sus consejos durante la realización del presente proyecto.
- Dr. Armando García Ortega gracias por su apoyo, consejos y observaciones acertadas que sirvieron para realizar una mejor investigación.
- A los sinodales Dr. Enrique de la Re Vega y Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro por su apoyo para la realización de la presente tesis.
- Dra. Chrystian Mariana Rodríguez Armenta por su por su tiempo, asesoramiento y ayuda que me brindó para la realización de esta investigación.
- A mis amigos Diana F., Norma, Alexander, Pablo, Brandon, Edgar, Daniel, Baldemar y Emi por su gran amistad, ayuda y por los buenos momentos que hemos compartido en estos años.
- A la familia Gómez Ramírez por su gran cariño y apoyo que me han brindado en esta etapa, los quiero mucho!
- Un especial agradecimiento a Carlos Maldonado por su gran amistad, apoyo brindado y sobre todo por formar conmigo un excelente equipo de trabajo.
- A mis compañeros de laboratorio, Carolina, María Luisa, Hugo y Carlos por su gran ayuda, amistad y por todos esos buenos momentos que compartimos a lo largo de este tiempo.

RESUMEN

La harina de pescado (HP) es una de las fuentes proteicas más importantes para la manufactura de alimentos acuícolas. Para promover la acuicultura sustentable se ha intensificado la búsqueda de fuentes alternativas de proteína, pero su efectividad en alimentos para peces marinos carnívoros debe evaluarse exhaustivamente. La totoaba (*Totoaba macdonaldi*), es un pez endémico del Golfo de California con alto potencial para diversificar la acuicultura en México. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el reemplazo parcial o total de harina de pescado por fuentes alternativas de proteína animal y vegetal en alimentos balanceados para *T. macdonaldi* y su efecto sobre la actividad enzimática y expresión génica de proteasas alcalinas. Para ello, se determinó el peso molecular de tripsina y quimotripsina de los ciegos pilóricos y del intestino anterior, así como la temperatura y pH óptimos para la actividad de estas proteasas. Se estimó un peso molecular de 24.1 kDa para tripsina y para quimotripsina fue de 25.9 kDa. Se observó actividad óptima de tripsina y quimotripsina a 65°C y 45°C respectivamente y a un pH de 8.0. Las características bioquímicas observadas, son una herramienta complementaria para conocer la fisiología digestiva para esta especie. Adicionalmente, se realizaron dos bioensayos en un sistema de recirculación. Al final de los bioensayos, se observó que juveniles de totoaba alimentados con mezcla *Arthrospira* sp. (70% *Arthrospira* sp., 15%HS, 15%SPC) y mezcla SPC (70% SPC, 15% *Arthrospira* sp., 15%HS) son buenas fuentes de nutrientes cuando se usan a un nivel de reemplazo del 33% de HP. Se observó que la proteína de soya hidrolizada cuando se usa a un nivel de reemplazo del 15% de HP resulta un en crecimiento y supervivencia y adecuados. Se concluye que las dietas evaluadas pueden sustituir parcialmente a la harina de pescado sin afectar negativamente los parámetros de producción.

ABSTRACT

Fishmeal (FM) is one of the most important protein sources to manufacture aquafeeds, though, to promote a more sustainable aquaculture, the search for alternative protein sources has intensified. The effectiveness of such products in feeds for carnivorous marine fish should be evaluated thoroughly. The totoaba (*Totoaba macdonaldi*), is an endemic fish of the Gulf of California with excellent traits as a candidate species for aquaculture in México. The objective of the present study was to evaluate the partial and total replacement of fishmeal by alternative plant and animal protein feedstuffs in balanced feeds for *T. macdonaldi* and its effect on enzymatic activity and gene expression of alkaline proteases. Molecular weights of trypsin, chymotrypsin from pyloric caeca and anterior intestine were evaluated, as well as optimum temperature and pH for activity of the proteases. Molecular weight of trypsin was estimated to be 24.1 kD, and for chymotrypsin 25.9 kDa. Optimal activity of trypsin and chymotrypsin were observed at 65°C and 45°C respectively, and pH of 8.0. The biochemical characteristics observed, represents a complementary tool to the knowledge of the digestive physiology for this species. In addition, two experiments were conduct in a recirculation aquaculture system. At the end of the experiments, juvenile totoaba fed *Arthrospira* sp. (70% *Arthrospira* sp., 15%HS, 15%SPC) and SPC (70% SPC, 15% *Arthrospira* sp.,) blends are good sources of nutrients when used at a replacement level of 33% of FM. The diets containing hydrolyzed soy protein meal when used at a replacement level of 15% results in good growth and survival. In conclusion, the results of the present study are promising, and indicate that fishmeal can be partially replaced by alternative protein sources without negatively affecting growth of juvenile totoaba.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PUBLICACIONES	4
II.1 Activity and partial characterization of trypsin, chymotrypsin, and lipase in the digestive tract of <i>Totoaba macdonaldi</i>	5
II.2 Use of alternative plant and animal protein blends, in place of fishmeal, in diets for juvenile totoaba, <i>Totoaba macdonaldi</i>	6
II.3 Incorporating black soldier fly larvae meal (<i>Hermetia illucens</i>) and hydrolyzed soy protein into feeds for <i>Totoaba macdonaldi</i>	7
III. DISCUSIÓN	8
IV. CONCLUSIONES	20
V. RECOMENDACIONES	21
VI. LITERATURA CITADA	22

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Lista de artículos publicados y enviados durante el periodo 2017-2021.	4

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha convertido en una de las industrias con mayor crecimiento a nivel mundial, desde sus inicios en los países asiáticos, hasta su desarrollo en países de Centroamérica y Sudamérica. Esta expansión ha traído como consecuencia un aumento en la oferta de alimentos de origen acuático (FAO, 2020).

Entre los principales grupos de organismos cultivados están los crustáceos, moluscos y peces.

En los últimos años el cultivo de peces marinos a nivel mundial tuvo un rápido crecimiento, debido al desarrollo y optimización de las tecnologías de producción, promoviendo el incremento de especies con potencial para la acuicultura. Además, el cultivo de peces marinos permite la producción, comercialización y repoblación de algunas especies, debido a que las poblaciones naturales han sido afectadas por distintas causas como la sobre explotación pesquera (Hua et al., 2019). El cultivo de numerosos peces marinos es una oportunidad de trabajo en la investigación aplicada de esos cultivos, orientados a garantizar el suministro de productos de excelente calidad para el consumidor. La búsqueda de nuevas especies que apoyen la diversificación de la acuicultura debe basarse principalmente en ser un cultivo rentable y sustentable con el medio ambiente. El manejo adecuado del alimento y la alimentación dentro del cultivo son aspectos fundamentales que deben tomarse en cuenta en aras de una acuicultura sustentable. Este aspecto es de suma relevancia si se considera que la alimentación es uno de los factores más importantes dentro de los costos de producción en las granjas acuícolas, llegando a representar hasta el 60% en la producción de peces (Tacon, 2011), por lo que es indispensable buscar alternativas para que su valor nutricional sea aprovechado al máximo.

Los alimentos formulados para peces idealmente deben de ser nutricionalmente eficientes para promover un óptimo crecimiento y engorda de los organismos. La proteína y los lípidos constituyen los macronutrientes que afectan de manera más importante la productividad de peces en cultivo comercial, no únicamente por tratarse de componentes que se hallan en proporciones significativas en las formulaciones, sino porque son los de mayor costo debido a que su abastecimiento generalmente proviene de una misma fuente, la harina y aceite de pescado provenientes del procesamiento de peces pelágicos menores (Jobling, 2016). La búsqueda de

fuentes alternativas de proteína y lípidos como ingredientes para la elaboración de los alimentos balanceados en la Acuicultura son una posible solución para abatir costos, y por otra, contribuyan a reducir el impacto ambiental (Hardy, 2006). Una de las primeras alternativas exploradas para el reemplazo de harina de pescado han sido otras fuentes de origen animal, como por ejemplo harina de sangre, harina de subproductos de aves, harina de insectos, entre otros (Tacon, 2011; Daniel, 2010, Nogales-Mérida, 2019) Otra alternativa sustentable, está representada por proteínas de origen vegetal provenientes de la industria agrícola, tales como harina de cereales, harina de soya, así como concentrados de proteína de soya, maíz y cebada, con resultados variables, pero en general promisorios (Bandara, 2018). Más recientemente, el uso de microalgas como fuentes alternativas de proteína y lípidos han llamado fuertemente la atención de investigadores y productores comerciales de insumos para acuicultura (Shah et al., 2018). Existe evidencia que estos productos han sido capaces de favorecer la eficiencia alimenticia, crecimiento, respuesta a estrés, resistencia a enfermedades, condición fisiológica y la calidad de la carne en varias especies de peces de importancia comercial en acuicultura, tales como *Epinephelus lanceolatus* (García Ortega et al., 2016), *Dicentrarchus labrax* (Torrecillas et al., 2017), *Salmo salar* (Sprague et al., 2015) y *Sparus aurata* (Eryalçin y Yildiz, 2015). El estudio de la nutrición de peces en acuicultura se ha visto fortalecido en años recientes mediante la incorporación de nuevas disciplinas que ayudan a explicar los procesos nutricionales y de alimentación, desde su fisiología digestiva a nivel enzimático hasta molecular. Además, este conocimiento constituye una herramienta complementaria para comprender la funcionalidad del sistema digestivo y de los efectos de los nutrientes en las dietas sobre el desempeño biológico de los peces, permitiendo diseñar alimentos formulados de manera más eficiente. En México el estudio de la nutrición de peces nativos está orientado a evaluar la proteína y lípidos contenidos en los alimentos balanceados con la finalidad de determinar los requerimientos nutricionales óptimos de las especies de interés para desarrollar su potencial de cultivo. En este sentido, se ha evaluado el efecto en el crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia cuando se alimentan a los organismos con distintos ingredientes de varias fuentes proteicas para la sustitución de la harina de pescado en dietas para peces carnívoros. En los últimos años se han realizado numerosos estudios en diversas especies prioritarias, entre las que destacan *Seriola lalandi*, *Seriola rivoliana*, *Lutjanus guttatus*, *Paralichthys californicus*, *Cynoscion othonopterus* y *Totoaba macdonaldi* (González-Félix et al., 2011). Recientemente, totoaba (*T. macdonaldi*) es

considerada como una especie potencial para diversificar la acuicultura en México, debido a sus altas tasas de crecimiento, factor de conversión alimenticia y calidad de su filete. Los peces carnívoros como la totoaba, dependen directamente del abastecimiento de proteína para su sustento, por esta razón se hace necesaria la investigación sobre la aceptación del pez para los nuevos alimentos balanceados, la digestibilidad de los ingredientes y las enzimas digestivas que hidrolizan la fuente proteica para que ésta pueda ser absorbida.

II. PUBLICACIONES

Los artículos derivados del trabajo realizado en el presente proyecto se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de artículos publicados y enviados durante el periodo 2017-2021.

ARTÍCULO	JOURNAL	ESTADO
II.1. Activity and partial characterization of trypsin, chymotrypsin, and lipase in the digestive tract of <i>Totoaba macdonaldi</i> .	Journal of Aquatic Food Product Technology	Publicado
II.2. Use of alternative plant and animal protein blends, in place of fishmeal, in diets for juvenile totoaba, <i>Totoaba macdonaldi</i> .	Aquaculture	Publicado
II.3. Incorporating black soldier fly larvae meal (<i>Hermetia illucens</i>) and hydrolyzed soy protein into feeds for <i>Totoaba macdonaldi</i>	Aquaculture	Sometido

II. 1 Villanueva-Gutiérrez, E., Maldonado-Othón, C.A., Perez-Velazquez, M., González-Félix, M.L. 2020. Activity and partial characterization of trypsin, chymotrypsin and lipase in the digestive tract of *Totoaba macdonaldi*. Journal of Aquatic Food Product Technology 29, 322-334. Por respeto al derecho de autor, no se reproduce la totalidad del artículo.

JOURNAL OF AQUATIC FOOD PRODUCT TECHNOLOGY
2020, VOL. 29, NO. 4, 322-334
<https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1733157>



Activity and Partial Characterization of Trypsin, Chymotrypsin, and Lipase in the Digestive Tract of *Totoaba macdonaldi*

Emmanuel Villanueva-Gutiérrez , Carlos A. Maldonado-Othón , Martin Perez-Velazquez , and Mayra L. González-Félix 

Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Hermosillo, Mexico

ABSTRACT

Molecular weights of trypsin, chymotrypsin, and lipase from anterior intestine and pyloric caeca of *Totoaba macdonaldi* were evaluated, as well as optimum temperature and pH for activity of the proteases. Trypsin was 24.1 kDa and effectively hydrolyzed *N*-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride at optimum pH and temperature of 8 and 65°C, respectively. Chymotrypsin was 25.9 kDa and showed higher hydrolytic activity for *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester at pH 8 and 45°C, with a wider range of statistically similar activity values. Two pancreatic lipases of 70.2 and 47.5 kDa were detected, which could be the uncleaved and the final form of a colipase-dependent pancreatic lipase, since enzyme activity was detected without supplementation of bile salts and supplementing them inhibited activity.



KEYWORDS

Trypsin; chymotrypsin; pancreatic lipase; enzymatic activity; *Totoaba macdonaldi*

Introduction

In finfish, digestive enzymes play a key role in the hydrolysis of dietary protein and lipid to produce chyme with nutrients that will be taken up from the intestine and transported through the bloodstream to different organs and tissues. The characterization of their proteases and lipases has focused mainly on identifying the type of digestive enzymes present within the gastrointestinal tract (GIT) of species of interest in order to assess their role in the digestive physiology, establishing their molecular weight, optimal pH, and temperature of activity and assessing their potential use as alternative sources of bioactive molecules for biotechnological applications (Haard 1992; Kurtovic et al. 2009; Vecchi and Coppes 1996). Within the intestine and pyloric caeca of fish, trypsin, chymotrypsin, and lipases (e.g. bile salt-dependent lipase and colipase-dependent lipase) are the most important digestive enzymes due to their high proteolytic and lipolytic activities (Bougatef 2013; Kurtovic et al. 2009; Zhou et al. 2011). However, enzymatic activity varies among fish species, requiring a characteristic pH and temperature where the activity is maximum, and its active centers have an adequate ionic conformation to carry out catalysis efficiently (Rust 2002). Consequently, evaluating factors such as the effect of pH and temperature on the activity of digestive enzymes, affinity for specific substrates, specific inhibitors, and characterization by electrophoretic techniques is of great interest (Gisbert et al. 2018).

Trypsin, chymotrypsin, and lipase from pancreatic origin are $\alpha\beta$ -hydrolases that possess a catalytic triad in their structure, consisting of histidine (base), aspartate (acidic residue), and serine (nucleophile), although lipases can also have glutamate as an acidic residue (Nardini and Dijkstra 1999; Smith et al. 1992). Trypsin and chymotrypsin are the main enzymes responsible for concluding jointly the fine hydrolysis of peptides previously hydrolyzed in the stomach (Simpson 2000), while pancreatic lipase preferably hydrolyzes acylglycerols in the presence of colipase, a coenzyme also

CONTACT Mayra L. González-Félix  m.mayra.gonzales@unison.mx  Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Edif. 7-G, Blvd. Luis Donaldo Colosio S/n, e/Sahuaripa Y Reforma, Col. Centro, C.P. Hermosillo, Sonora 83000, Mexico.
© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

II. 2 Villanueva-Gutiérrez, E., González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Perez-Velazquez, M. 2020. Use of alternative plant and animal protein blends, in place of fishmeal, in diets for juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 529, 735698. Por respeto al derecho de autor, no se reproduce la totalidad del artículo.

Aquaculture 529 (2020) 735698



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture



Use of alternative plant and animal protein blends, in place of fishmeal, in diets for juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi*



Emmanuel Villanueva-Gutiérrez^a, Mayra L. González-Félix^a, Delbert M. Gatlin III^b, Martin Perez-Velazquez^{a,*}

^a Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Hermosillo, Sonora C.P. 83000, Mexico

^b Department of Wildlife and Fisheries Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2258, USA

ARTICLE INFO

Keywords

Totoaba macdonaldi
Fishmeal replacement
Soy protein concentrate
Blood meal
Arthrospira sp.
Growth performance

ABSTRACT

The present study evaluated the replacement of fishmeal (FM) by blends of alternative protein sources in diets for juvenile (8.0 ± 0.5 g) *Totoaba macdonaldi*. Using a FM-based control diet containing 53% crude protein and 13% crude fat, a 3×3 factorial experiment was conducted replacing FM, at levels of 33, 66 and 100% by weight, with three blends of the test ingredients, as follows: 1) *Arthrospira* meal blend: 70% *Arthrospira* sp. meal, 15% blood meal, 15% soy protein concentrate (SPC); 2) blood meal blend: 70% blood meal, 15% *Arthrospira* sp. meal, 15% SPC; and 3) SPC blend: 70% SPC, 15% blood meal, 15% *Arthrospira* sp. meal. At the end of the 6-week feeding trial, significant effects of the alternative protein blends were detected, in which fish fed the *Arthrospira* meal and SPC blends had significantly ($P < .05$) better performance than fish fed the blood meal blend across all growth parameters (percent weight gain and thermal growth coefficient) and feed utilization indices (feed efficiency and protein efficiency ratio). Also, fish fed the former two blends deposited more crude protein and fat in whole body and muscle tissues, concurring with the growth response observed. However, the effects of protein blend on body condition indices (hepatosomatic index, condition factor, and muscle ratio) and on the concentrations of trypsin and chymotrypsin in anterior intestine and pyloric caeca, did not depict clear trends. A correspondence between levels of dietary amino acids (AA) in blends and accumulated AA in muscle, was not observed. However, significant effects of the level of FM replacement were also detected, in which the responses in growth, feed utilization, most body condition indices, and proximate composition of fish whole body, deteriorated as the level of FM replaced increased. All things considered, results indicate that the *Arthrospira* meal and SPC blends, but not the blood meal blend, can be used to replace at least 33% FM in the diet for totoaba, without adversely affecting growth and survival. The possible reasons for the decreased performance of fish fed the blood meal blend, or when fed any of the blends at levels higher than 33%, are discussed.

1. Introduction

In the rapid expansion of aquaculture, fishmeal (FM) has been the preferred source of protein for aquafeeds, especially those formulated for carnivorous species, due to its balanced content of amino acids (AA), high protein content, adequate fatty acid composition, high palatability, and lack of anti-nutritional factors (National Research Council (NRC), 2011; FAO, 2018). Unfortunately, the world stocks of forage fish species used to produce FM (e.g., sardine, anchovy, menhaden, etc.) are currently considered fully or overexploited (FAO, 2018), which has limited its availability and increased the price in response to rising demand from the growing aquaculture sector (Tacon

et al., 2011). Thus, it is clear that the aquaculture industry cannot continue to heavily rely on this source of protein. To remedy this situation, scientists and manufacturers of aquafeeds have sought alternative protein sources that, ideally, should be inexpensive, readily available, and of high nutritional value for a more sustainable aquaculture (Jobling, 2016). In this respect, considerable success has been achieved in partial, and sometimes, total replacement of FM by processed animal and plant protein sources, as well as novel proteins, such as microalgae and yeasts (Bandara, 2018).

Soy protein concentrate (SPC) is one of the plant protein feedstuffs most frequently observed to promote acceptable growth of various fish species when used as partial replacement of FM (Salze et al., 2010;

* Corresponding author at: Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Edificio 7-G, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, e/Sahuaripa y Reforma, Col. Centro, C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico.
E-mail address: martin.perez@unson.mx (M. Perez-Velazquez).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735698>

Received 8 May 2020; Received in revised form 13 June 2020

Available online 10 July 2020

0044-8486/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

II. 3 Incorporating black soldier fly larvae meal (*Hermetia illucens*) and hydrolyzed soy protein into feeds for *Totoaba macdonaldi*. Artículo enviado a Aquaculture de Elsevier.

Aquaculture

Incorporating black soldier fly larvae meal (*Hermetia illucens*) and hydrolyzed soy protein into feeds for *Totoaba macdonaldi*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Vertebrate Nutrition
Keywords:	Totoaba macdonaldi; fishmeal replacement; black soldier fly, hydrolyzed soy protein; growth performance
Corresponding Author:	Martin Perez-Velazquez University of Sonora Hermosillo, Sonora Mexico
First Author:	Emmanuel Villanueva-Gutiérrez
Order of Authors:	Emmanuel Villanueva-Gutiérrez Chrystian Rodriguez-Armenta, Ph.D. Mayra L. González-Félix, Ph.D. Martin Perez-Velazquez, Ph.D.
Abstract:	<p>A 7-week study was conducted to evaluate the replacement of fishmeal (FM) by hydrolyzed soy protein (HSP) and black soldier fly larvae meal (BSFM) in diets for <i>Totoaba macdonaldi</i> juveniles (2.5 ± 0.1 g). A control diet containing FM as the main protein source was formulated with crude protein and crude fat contents of 52% and 14%, respectively. Then, in a series of isoproteic and isocaloric diets, HSP was incorporated at levels of 15 and 25%, and BSFM at levels of 25 and 40%, in place of FM by weight. Fish fed the control diet and the diet containing HSP at 15% FM replacement had similar performance across all growth parameters, feed utilization, and body indices. For example, final weight of 59.72 and 59.41 g, respectively, and FCR of 0.94 and 1.02, respectively. In contrast, fish fed HSP at 25% FM replacement had significantly inferior final weight (46.59 g) and FCR (1.19). Fish fed BSFM at both levels of inclusion (25 and 40%) resulted in significantly reduced growth (final weight of 48.11 and 42.8 g, respectively) and also reduced FCR (1.06 and 1.30, respectively), as compared to fish fed the control diet. Minimal changes in whole body proximate composition of fish and no changes in proximate and amino acid composition of muscle tissue were observed in response to dietary HSP or BSFM. Compared to fish fed the control diet, the fold change in trypsin gene expression increased significantly in fish fed 25% HSP, but not in fish fed 15% HSP. A similar numerical trend was observed for chymotrypsin gene expression, although differences were not statistically significant ($P = 0.0768$). No significant differences were observed for the gene expression of both enzymes in response to dietary BSFM; regulation of both proteases appears to take place at a transcriptional level. In summary, at least 15% of dietary fishmeal can be replaced by hydrolyzed soy protein without altering growth, survival, or any feed utilization and body indices of <i>T. macdonaldi</i> juveniles.</p>

III. DISCUSIÓN

El conocimiento de la fisiología digestiva de los peces ha brindado información importante para definir sus requerimientos nutricionales. Esta área de estudio se ha abordado por medio de la cuantificación bioquímica de diversas enzimas tales como proteasas lipasas y amilasas, que son las enzimas digestivas que actúan como catalizadores biológicos de los nutrientes (Lazo et al., 2007). En el presente estudio, el peso molecular de tripsina fue de 24.1 kDa, mientras que el peso molecular de quimotripsina fue de 25.9 kDa presentes en el tracto digestivo de *T. macdonaldi*, detectándose una banda respectivamente. En general, se ha reportado que la tripsina de peces tiene un peso molecular de 23 – 28 kDa y para quimotripsina entre 25 y 28 kDa en tejidos de ciegos pilóricos, intestino y vísceras de peces (Jesús-de la Cruz et al., 2018; Simpson, 2000). Resultados similares por Lazo et al. (2007) reportan tripsina con un peso molecular de 23 kDa y Applebeaum et al. (2001) para quimotripsina con 25 kDa en *Sciaenops ocellatus* una especie emparentada perteneciente a la familia Sciaenidae al igual que totoaba. La tripsina de *T. macdonaldi* presentó una temperatura óptima de actividad de 65°C y un pH óptimo de 8.0; para el caso de la quimotripsina presentó una temperatura y pH óptimos de 45°C y 8.0, respectivamente. La tripsina de peces marinos muestra una actividad óptima entre 40°C – 70°C y un pH entre 7.0 y 10.0, mientras que la quimotripsina exhibe una actividad óptima de 40°C y 65°C y a un pH en un rango de 7.5 y 9.0 (Shahidi & Janak, 2001; Kurtovic et al., 2006). Las diferencias de temperatura y pH óptimos se asocian con diferencias de los factores abióticos del hábitat de una especie de pez en particular, así como las modificaciones en los sustratos o condiciones utilizadas en los procedimientos analíticos, como preparaciones de los extractos enzimáticos y tiempos de incubación (Scopes, 2002; Zhou et al., 2011a; Solovyev et al., 2018). En la actualidad las proteasas constituyen el grupo más importante de enzimas utilizadas en la industria a nivel mundial, sin embargo, la mayoría de las proteasas en el mercado son de origen bovino o porcino. Las proteasas de organismos acuáticos presentan mejores características bioquímicas y catalíticas que sus homologas de organismos terrestres (Simpson, 2000). El aprovechamiento de los subproductos de la pesca no solo es importante por la recuperación de enzimas, también puede contribuir de manera significativa a la reducción de la contaminación local. El estudio de las enzimas digestivas presentes en el tracto gastrointestinal de totoaba contribuyó a comprender mejor su fisiología digestiva, que, a su vez, será útil para mejorar las

dietas balanceadas actualmente disponibles para esta especie. El tracto digestivo de *T. macdonaldi* podría convertirse en un subproducto valioso al final del ciclo de producción y podría tener aplicaciones industriales potenciales.

En los últimos años, se han realizado numerosos avances en el desarrollo de dietas balanceadas para peces en acuicultura, y con el surgimiento de nuevas especies potenciales, existe una clara necesidad de formular dietas específicas para cada especie que se cultiva (Nates, 2016). Generalmente los requerimientos proteicos en las especies de peces carnívoros varían entre 30% a 55% de proteína cruda en su dieta, según la especie a cultivar, la edad, la fuente proteica y las condiciones ambientales (NRC, 2011). La formulación de alimento balanceado debe considerar un contenido adecuado de proteína ya que es utilizada fundamentalmente para mantenimiento de los organismos vivos, para la síntesis de músculo y tejidos, crecimiento, e inclusive la formación de nuevas estructuras proteicas. El éxito en el adecuado desempeño biológico de los organismos en cultivo depende en gran medida de una adecuada formulación y elaboración de dietas, pero también de estrategias de alimentación óptimas para los diversos sistemas de cultivo (Lekang, 2015). A la fecha se han realizado numerosos estudios con peces carnívoros, evaluando el efecto del reemplazo de la harina de pescado con distintas fuentes proteicas en dietas balanceadas, teniendo como principal objetivo el no afectar negativamente el crecimiento de los organismos y reducir el costo de producción para incrementar la sustentabilidad de la producción acuícola (Oliva-Teles y Peres, 2015). Los ingredientes utilizados en acuicultura pueden evaluarse mediante una variedad de pruebas químicas y biológicas. Sin embargo, el mejor método para evaluar la calidad nutricional de dietas formuladas es alimentarlas a peces y comparar sus respuestas con las de peces alimentados con una dieta control, de valor nutricional conocido (Bureau, 2011).

Totoaba macdonaldi es una especie marina carnívora que responde efectivamente al alimento balanceado. Diversos estudios han reportado resultados alentadores en su desempeño biológico e índices de utilización del alimento muy efectivos (Bañuelos-Vargas et al., 2014; Trejo-Escamilla et al., 2016; Fuentes-Quesada et al., 2018; Mata-Sotres et al., 2018), por tales motivos, se considera que esta especie tiene un excelente potencial para su producción intensiva.

El presente estudio mostró que las mezclas de proteínas alternativas, basadas en concentrado de proteína vegetal, subproductos de origen animal y de organismos unicelulares,

pueden reemplazar parcialmente la harina de pescado en dietas balanceadas para *Totoaba macdonaldi*. De las tres mezclas proteicas evaluadas sólo hasta el 33% de reemplazo de la harina de pescado fue viable, sin presentar efectos adversos en el crecimiento o supervivencia, utilizando aquellos en los que *Arthrospira* sp. (mezcla *Arthrospira* sp.) y SPC (mezcla SPC) fueron los componentes de mayor proporción. Peces carnívoros alimentados con mezclas de proteínas alternativas, presentan crecimiento reducido con altos niveles (> 45%) de reemplazo de harina de pescado, sucediendo este efecto en diferentes especies como el pargo japonés (*Pagrus major*) con dietas de mezcla de soya fermentada y subproductos de vieiras (Kader et al., 2011), y la curvina gigante (*Nibea japonica*) en presencia de una mezcla de subproductos de ave y harina de plumas (Wu et al., 2018). Niveles de reemplazo limitados se han asociado típicamente con características inferiores de los alimentos proteicos utilizados, tales como mala palatabilidad y/o digestibilidad reducida, presencia de factores anti-nutricionales o deficiencia de aminoácidos. Los resultados del presente estudio demuestran que el crecimiento reducido de totoaba cuando fueron alimentados con altos niveles de la mezcla de *Arthrospira* sp. Pueden estar asociados con bajos niveles de digestibilidad, ello puede atribuirse a la compleja estructura de la pared celular de las microalgas y cianobacterias, que le da rigidez, o los polisacáridos no almidonados indigeribles que en ella se encuentran (Sili et al., 2012; Agboola et al., 2019). Se ha reportado una alta digestibilidad de *Arthrospira* sp. en dietas para *Oreochromis niloticus*, *Clarias gariepinus*, *Catla catla* y *Labeo rohita*, pero debe considerarse que estos organismos son herbívoros u omnívoros y que poseen un intestino extenso que les permite tener mayor tiempo para digerirlos nutrientes (Nandeesh et al., 2001; Teuling et al., 2017). En cambio, los peces carnívoros como *T. macdonaldi* poseen un intestino corto, afectando tanto la cinética de la digestión, por lo que explica que su alto nivel de inclusión en la dieta puede estar limitada, derivado de la baja tasa de crecimiento observada. Walker y Berlinsky (2011), reportaron resultados similares para *Gadus morhua*, observando que tanto el consumo de alimento como el crecimiento de los peces disminuye cuando aumenta el nivel dietario de una mezcla de microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. aumentando de 14.0 a 28.1% del peso seco en la dieta. En el presente estudio, el nivel viable de inclusión de *Arthrospira* sp. más alto (mezcla de *Arthrospira* sp. a un nivel de reemplazo de harina de pescado del 33%) correspondió al 25.35% de la dieta. Curiosamente, estudios recientes mostraron que un nivel de inclusión similar (28.87% de harina de *Arthrospira* sp.) fue tolerado por la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) y

la lobina rayada híbrida (*Morone chrysops*♀ x *Morone saxatilis*♂) (Perez-Velazquez et al., 2018, 2019). La tolerancia fisiológica de los peces a la proteína de origen vegetal en dietas balanceadas depende de cada especie y del nivel de inclusión, debido a la presencia de factores anti-nutricionales (Gatlin et al., 2007). Aunque algunos ingredientes derivados de las plantas, como el concentrado de proteína de soya (SPC), se caracteriza por una alta digestibilidad y componentes anti-nutricionales bajos, en comparación con a harina de soya (Yaghoubi et al., 2016). Para los peces que pertenecen a la misma familia que la totoaba (*Sciaenidae*), es posible la inclusión de niveles relativamente altos de SPC en combinación con SBM (harina de soya). en este sentido la especie más estudiada es la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*); por ejemplo, McGoogan y Galtin (1997) reportaron una sustitución exitosa del 90% de harina de anchoveta por SBM, correspondiendo a un 66.64% en peso de la dieta, el cual es la más alta inclusión reportada para esta especie. En otros estudios se ha reportado que el utilizar SPC solo o en combinación con SBM, se puede reemplazar la harina de pescado entre un 50 a 86% sin afectar el crecimiento y la utilización del alimento (Rossi et al., 2015, 2017; Minjarez-Osorio et al., 2016). En la corvina amarilla (*Larimichthys crocea*), se logró el reemplazo total de harina de pescado utilizando una dieta que contenía 44.73% de SPC y 13.0% de SBM (Wang et al., 2017). Por otra parte, la corvina de aleta corta (*Cynoscion parvipinnis*) aceptó de manera eficaz una dieta que contenía 42.5% de SPC en peso seco, al reemplazar un 75% de harina de menhaden, además aceptó niveles bajos de SBM (33.1%) al reemplazar un nivel del 50% de harina de menhaden (Minjarez-Osorio et al., 2016). En totoaba, un estudio reciente utilizando SPC, reportaron que las dietas que contenían hasta un 30% de reemplazo de la harina de pescado, no exhibieron efectos adversos en crecimiento y supervivencia (Trejo-Escamilla et al., 2016). Además, Fuentes-Quesada et al. (2018) describieron los cambios en la morfología del intestino distal de totoaba alimentados con distintos niveles de SBM dietario, encontrando que incluso en el nivel más bajo evaluado (22%: 16% SBM + 6% SPC), alteraciones morfológicas del intestino distal los cuales son asociados típicamente con enteritis, seguido de un reducido crecimiento y pobre utilización del alimento. En la presente investigación, el nivel más alto viable para el reemplazo de la harina de pescado utilizando la mezcla de SPC fue de 33%, la cual tenía un contenido de 26% de SPC en peso seco. En el nivel posterior de reemplazo de harina de pescado (66%), la dieta contenía 37% de SPC, la cual aún se encontraba por debajo del nivel máximo de 45%, previamente determinado (Trejo-Escamilla et al., 2016). Sin embargo, la diferencia en la

cantidad de SPC utilizada y las interacciones con los otros ingredientes proteicos presentes en la mezcla probablemente influyó en un crecimiento deficiente y bajo aprovechamiento del alimento. Por otra parte, en el presente estudio en comparación con los peces alimentados con la mezcla de *Arthrospira* sp. y mezcla de SPC, los peces alimentados con la mezcla de harina de sangre depositaron menos proteína cruda y grasa, coincidiendo con los efectos negativos que esta mezcla tuvo sobre el crecimiento. En general, la respuesta de diferentes especies de peces a las dietas con inclusión de harina de sangre ha sido muy variable, pero la mayoría de los peces no han podido tolerar niveles superiores al 20% de harina de sangre en las dietas (Abery et al., 2001). Se sabe que la harina de sangre contiene altos niveles de hierro (2769 mg kg^{-1}) y zinc (306 mg kg^{-1}) (NRC, 2011). El hierro es un elemento traza que es esencial para la producción y el funcionamiento normal de hemoglobina, mioglobina, citocromos y muchos otros sistemas de enzimas. En vertebrados, el principal papel del hierro es como componente de la hemoglobina (Davis y Gatlin, 1996). El requerimiento de hierro en ciertos peces se ha establecido cuantitativamente en un rango de 30-170 mg/kg en la dieta (Lall, 2002). Por lo contrario, la deficiencia dietaria del hierro puede causar anemia y está caracterizada por un reducido crecimiento y bajos niveles de hemoglobina en peces (Lall, 2002). Las dietas para peces generalmente contienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadenas largas (LC-PUFA), que son altamente susceptibles a las reacciones de oxidación cuando se exponen al aire. Dentro de este contexto, la oxidación de lípidos catalizada por hierro aumenta con la suplementación de hierro, lo que a su vez afecta negativamente la estabilidad del alimento. Además, el hierro es uno de los metales primarios involucrados en la oxidación de lípidos y el hierro ferroso es el catalizador más potente de lípidos por oxidación (Davis y Gatlin, 1996). La presencia de aceites oxidados hace que el alimento tenga un sabor desagradable, reduciendo el consumo (es decir, causa un problema de palatabilidad) y creando sabores indeseables en el pescado. Por lo tanto, se puede esperar que la suplementación de hierro ferroso (harina de sangre) en la dieta afecte la estabilidad de la dieta a través del aumento de la oxidación lipídica (rancidez). Desjardins et al. (1987) reportan que la suplementación de dietas con sulfato ferroso causó oxidación de lípidos catalizada por hierro en las dietas, aumentando la concentración de maldoaldehído (MA) con el aumento del nivel de hierro y, por ello, el efecto de la rancidez de la dieta y el exceso de hierro condujo a un deficiente crecimiento y alta mortalidad de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. Es oportuno mencionar que, en el presente estudio, no se

estimaron las concentraciones de hierro y zinc en las dietas. Sin embargo, se cree que la combinación de los altos niveles de hierro y zinc presentes en las dietas experimentales con mayor contenido de harina de sangre pudieron causar rancidez e indujeron un deficiente desempeño biológico y limitada utilización del alimento en *T. macdonaldi*. De lo anterior se desprende que, como otros peces marinos, es probable que *T. macdonaldi* tampoco sea capaz de tolerar inclusiones por arriba de 20% de harina de sangre. Los resultados del presente estudio indican que, bajo estas condiciones experimentales, el 100% de reemplazo de la harina de pescado no fue viable con ninguna de las mezclas proteicas probadas, como lo indicaron las mortalidades en masa observadas a los 17 días de cultivo. No cabe duda de que la supervivencia fue resultado directo de la ingesta de alimento, y resultado de la limitada contribución nutricional de algunas de las formulaciones con 100% de reemplazo de harina de pescado. Badillo-Zapata et al. (2014) reportaron mortalidades en masa prematuras (día 15 de cultivo) para totoaba cuando se reemplazó el 100% de harina de pescado con subproductos de aves, por lo que se deduce que para esta especie no es factible 100% del reemplazo de harina de pescado al menos con los ingredientes evaluados. Un factor adicional que puede limitar la aceptación del alimento con alto reemplazo de harina de pescado es la palatabilidad, observándose una aversión al sabor de la dieta. Se ha reportado que los peces poseen órganos sensoriales como el sistema gustativo, proporcionando la evaluación final de las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos cuando se encuentran en la cavidad bucal. Como resultado de estas pruebas orales, el alimento puede ser rechazado o ingerido. El tiempo durante el cual el alimento u objeto se mantiene en la boca antes de tragarlo o escupirlo se denomina tiempo de retención. Durante el tiempo de retención, el pez detecta y reconoce las sustancias, evaluando si es suficiente para garantizar su idoneidad como alimento. La duración de una respuesta gustativa suele ser relativamente corta y termina al tragar el alimento o ignorarlo, cuando se pierde interés en él (Kasumyan y Doving, 2003; Morais, 2016). Esto parece confirmar lo que reportan Monge-Ortiz et al. (2018) al reemplazar totalmente la harina de pescado en dietas para *Seriola dumerii*; estas consideraciones fundamentan lo observado en este estudio, *T. macdonaldi* también es selectiva en su alimentación. Las concentraciones de tripsina y quimotripsina en el tracto digestivo de totoaba no muestran tendencias claras, lo que puede explicarse por el hecho de que las mezclas evaluadas consistían en diferentes ingredientes proteicos con perfiles de aminoácidos variables. Rungruangsak-Torrissen et al. (2006) no encontraron una relación específica entre las actividades

de tripsina y quimotripsina durante la alimentación del salmón del Atlántico en su fase de crecimiento. Tripsina es altamente sensible a los inhibidores de proteasas o modificaciones en la actividad digestiva pueden ocurrir en individuos en respuesta a la disponibilidad del alimento. Por lo general, se observan variables respuestas en la actividad o concentración de estas proteasas entre las especies de peces cultivadas como resultado del reemplazo de la harina de pescado en la dieta; sin embargo, la evaluación de enzimas digestivas en una especie con potencial para la acuicultura puede ser útil en la selección de ingredientes proteicos y sus posibles restricciones, en términos de los niveles máximos y mínimos de inclusión para la formulación de alimentos balanceados.

La proteína vegetal hidrolizada se ha convertido recientemente en una atractiva alternativa para el reemplazo de la harina de pescado debido a los pequeños péptidos de bajo peso molecular (< 5 kDa) y son, además, fácilmente absorbidos en el tracto digestivo (Hou et al., 2017). Los resultados de la presente investigación indican que juveniles de *T. macdonaldi*, alimentados con proteína de soya hidrolizada (HSP) a un nivel de reemplazo del 15% de harina de pescado tuvieron un desempeño en crecimiento, supervivencia y utilización del alimento adecuado y semejante con respecto a los peces alimentados con la dieta control. Sin embargo, el desempeño biológico y los índices de utilización del alimento de los peces alimentados con harina de HSP a un nivel de reemplazo del 25% fueron significativamente inferiores. Para el caso particular de los productos derivados de la soya, los niveles limitados de reemplazo se han asociado típicamente con características inferiores de estas fuentes de proteína, como la presencia de los factores anti nutricionales, la deficiencia de aminoácidos esenciales (lisina y metionina), entre otros compuestos, los cuales de manera conjunta pueden causar una inflamación no infecciosa en el intestino llamada “enteritis” conduciendo a una deficiente digestión y absorción de nutrientes especialmente en peces carnívoros (Kumar et al., 2020b). Existen varios estudios con variables resultados sobre el desempeño en crecimiento y los índices de utilización del alimento evaluando varios niveles de productos de soya en diferentes especies. Por ejemplo, Arriaga-Hernández et al. (2021) reporta que el reemplazo del 15 a 45% de harina de pescado por SBM es viable en dietas para juveniles de *Centropomus viridis* sin afectar su crecimiento, digestibilidad o capacidad digestiva; para *Sparidentex hasta*, Yaghoubi et al. (2016) reportan que el máximo nivel de reemplazo de harina de pescado con productos de soya es entre 16.5 y

27.3%, debido a que los parámetros de crecimiento y de utilización del alimento se fueron deteriorando al incrementar los niveles de productos de soya en la dieta, en otro estudio Viana et al. (2019) indican que para *Seriola dorsalis* alimentados con dietas basadas en SBM con niveles de inclusión superiores al 10%, causa daños a la fisiología intestinal para esta especie, por lo que sugieren que SBM debe utilizarse con precaución. Estos resultados contrastantes indican que están asociados básicamente a la tolerancia de los peces hacia los productos derivados de la soya, el origen de la soya o de las técnicas de procesamiento y tecnologías para la elaboración de las dietas.

Actualmente, la proteína de soya hidrolizada (HSP) es lo más novedoso, su proceso de refinamiento (hidrólisis enzimática y altas temperaturas) reduce la proteína a péptidos de bajo peso molecular (1-3 kDa), los cuales tienen la capacidad de ser absorbidos eficientemente por los peces, por tal motivo, aumenta el costo y limita su uso en alimentos acuícolas a gran escala (Singh et al., 2014; Hou et al., 2017; Debnath y Saika, 2021). Actualmente, falta información concerniente a la aplicación de HSP en alimentos acuícolas, aunque algunos estudios han demostrado que pueden promover eficazmente el crecimiento y eficiencia alimenticia. La proteína de soya hidrolizada puede reemplazar parcialmente a la harina de pescado en algunas especies, incluyendo al lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) con 20% de reemplazo de HP (Mamauag et al., 2011); el lenguado estrellado (*Platichthys stellatus*) con un 15-50% (Song et al., 2014) y el bagre plateado (*Rhamdia quelen*) hasta un 20% (Uczay et al., 2019). Por otra parte, el uso de la proteína de soya hidrolizada en otros estudios ha demostrado mejorar el crecimiento y la salud animal como lechones (Zhou et al., 2011b), pollos (Jiang et al., 2009, Wallace y Lang, 2010) y del pepino de mar (Song et al., 2011). Es importante mencionar que las variaciones de los hallazgos entre los peces y las especies terrestres posiblemente se deben a las diferencias en los requerimientos de nutrientes en la dieta, las estrategias de alimentación, las especies acuícolas, además, de las fracciones de péptidos y la concentración de proteína de soya hidrolizada. Se ha reportado que el exceso de HSP en la dieta puede causar saturación de los transportadores intestinales, de tal forma que da como resultado una rápida afluencia de péptidos lumenales y concentración de aminoácidos libres, dando como resultado un antagonismo de absorción (Mamauag et al., 2011). Por tanto, esta puede ser una razón importante por el reducido crecimiento observado en los peces alimentados con HSP a un nivel

de reemplazo del 25%. De manera similar, también se ha reportado esta misma observación para *Megalobrama amblycephala* alimentado con proteína de semilla de algodón hidrolizada (Yuan et al., 2020). Los resultados de la presente investigación indican que totoaba es sensible al consumo de proteína de soya hidrolizada. Cabe señalar que, totoaba al ser un típico pez marino carnívoro ha demostrado cierta intolerancia a la proteína de soya simple o en una mezcla, produciendo cambios morfológicos en el intestino, así como un deteriorado desarrollo y utilización proteica; y las consecuencias se agravan a medida que aumenta el nivel inclusión (Trejo-Escamilla et al., 2017; Fuentes-Quesada et al., 2018; Villanueva-Gutiérrez et al., 2020b). En este sentido, también es probable que la proteína de soya hidrolizada utilizada contenía algún factor tóxico causando lesiones en el intestino y disminuyendo la capacidad para asimilar los nutrientes de la dieta.

En el presente estudio, los juveniles de totoaba tienen una restringida capacidad para utilizar la harina de larvas de la mosca soldado negro de manera efectiva, ya que su inclusión en la dieta resultó en una disminución lineal del crecimiento y utilización del alimento. Estudios recientes reportan altos niveles de reemplazo de HP de 50 a 100% por harina de larvas de *H.illucens* sin una aparente reducción en el consumo de alimento y la consecuente reducción en crecimiento, incluso para peces carnívoros (Lock et al., 2016; Li et al., 2017; Renna et al., 2017; Wang et al., 2019). Sin embargo, algunos casos no fueron tan efectivos como se predijo, con un crecimiento y eficiencia alimenticia decreciente para el caso del esturión Siberiano (*Acipenser baerii*) (Caimi et al., 2020) y el lenguado (*Psetta máxima*) (Kroeckel et al., 2012). Además, Guerreiro et al., (2020a) reportan resultados similares para los juveniles de la corvina amarilla (*Argyrosomus regius*), un miembro de la misma familia que totoaba (Sciaenidae), cuando se alimentaron con un nivel de inclusión del 10% de BSFLM (correspondiente a un 25% de reemplazo de harina de pescado). Se ha sugerido que las variaciones en los productos derivados de la mosca soldado negro, así como la etapa de desarrollo larvario, sustratos de crecimiento (residuos de alimentos, frutas, vegetales, estiércol, granos), métodos de procesamiento utilizado para la producción de larvas y la presencia de quitina, podrían considerarse como los principales factores que contribuyan a explicar las diferencias específicas de especies en los peces que conducen a diferentes perfiles nutricionales (Tshirner y Simon, 2015; Caimi et al., 2020; Surendra et al., 2020; Zarantoniello et al., 2021). La presencia de quitina en la harina de larvas

de *H. illucens* podría ser una posible razón por su bajo valor nutricional para algunas especies de peces, lo que tiene como resultado efectos negativos sobre el crecimiento. Las especies silvestres de peces carnívoros comen principalmente peces y crustáceos, por lo tanto, pueden digerir la quitina. Cabe señalar que, la quitina de crustáceos se encuentra envuelta en una matriz de proteínas y minerales, principalmente calcio (Kumari et al., 2017); mientras que la cutícula de los insectos está formada por proteínas, lípidos y otros compuestos (Merzendorfer y Zimoch, 2003). La quitina es un polímero de N-acetil-D-glucosamina, el componente principal del exoesqueleto y endoesqueleto de los insectos. Además, el contenido de quitina de las prepupas y pupas de la mosca soldado negro es rico en quitina (11%), en comparación con las larvas (8%), lo que indica que la producción de quitina aumenta en estas etapas (Finke 2013; Soetemans et al., 2020). Por otra parte, se ha reportado que la quitina es una fibra muy insoluble y no digerible que contribuye a aumentar el volumen fecal y a ralentizar el tiempo de retención de las heces, lo que limita la accesibilidad de las enzimas digestivas (proteasas) a los sustratos (Gasco et al., 2019; Guerreiro et al., 2020a). Por lo tanto, afecta la absorción de nutrientes y la digestibilidad resultando en una disminución del crecimiento de los peces. Por ejemplo, el uso de la harina de BSFL en cierto sentido puede ser problemática debido a la digestibilidad de la quitina o la baja actividad de la quitinasa, causando una reducción en la ingesta del alimento y el crecimiento del lenguado (*Psetta maxima*) (Kroeckel et al., 2012), dorada (*Sparus aurata*) (Karapanagiotidis et al., 2014) y la corvina (*Argyrosomus regius*) (Guerreiro et al., 2020a). Por otro lado, la presencia de quitina en larvas de *H. illucens* no implica que necesariamente altos niveles de inclusión de BSFLM en la dieta sean indigeribles o que no se pueda producir peces de alto rendimiento (Fisher et al., 2020, Nairuti et al., 2021). En general, las discrepancias en el desempeño biológico entre los bioensayos podría estar relacionadas con los diferentes niveles de tolerancia de las larvas de *H. illucens* entre las diferentes especies de peces, así como con las diferentes ciclos de vida de los peces utilizados en los experimentos. Aunque el contenido de quitina de las larvas de *H. illucens* no se evaluó en el presente estudio, es posible que contribuya al bajo rendimiento observado en los altos niveles de inclusión de BSFLM. La inclusión de la harina de larvas de *H. illucens* en las dietas experimentales del presente estudio no tuvo un efecto sobre el contenido de proteína cruda, lípidos, humedad y cenizas en el tejido muscular de los juveniles de totoaba, una tendencia similar se ha observado en otras investigaciones, por ejemplo, un cultivo

experimental de la carpa Jian (Li et al., 2017), carpa herbívora (Lu et al., 2020) y el salmón del Atlántico (Belghit et al., 2019).

El intestino de los peces desempeña una función importante en la digestión y absorción de nutrientes, dependiendo básicamente de la función de enzimas digestivas, especialmente aquellas que se encuentran en los ciegos pilóricos y el borde de cepillo del intestino hidrolizando los nutrientes de los alimentos para que puedan ser absorbidos por los enterocitos; además, es particularmente sensible a los componentes de la dieta (Rust, 2002; Sunde et al., 2004). La alta actividad proteolítica y presencia de tripsina y quimotripsina para digerir la proteína de las dietas, en peces carnívoros como la totoaba, ha sido reportada previamente (Villanueva-Gutiérrez et al., 2020a). La influencia de la proteína dietaria sobre la actividad enzimática del tracto digestivo de los peces es bien conocida, sin embargo, su efecto a nivel molecular sobre estas enzimas aún es objeto de investigación (Yúfera et al., 2018; Santos et al., 2020). El estudio del nivel de expresión génica de las enzimas digestivas proporciona una estimación de la capacidad digestiva de los peces en diferentes tratamientos dietarios, por tanto, la conversión alimenticia en tejido corporal será más (o menos) eficaz en los peces. Los genes involucrados en la digestión están principalmente regulados a nivel transcripcional y sus perfiles de expresión parecen fluctuar dependiendo de la composición del alimento (Kortner et al., 2011; Yúfera et al., 2018). Por lo tanto, el análisis de los perfiles de tripsina y quimotripsina podría utilizarse como indicador del estado nutricional y para evaluar los efectos de diversos regímenes de alimentación y dietas en los peces. En el presente estudio, la expresión relativa de tripsina y quimotripsina aumentó con el incremento de los niveles de reemplazo de la harina de pescado por la proteína de soya hidrolizada. Se ha demostrado que los hidrolizados de proteínas, en particular los pequeños péptidos, alteran la digestión y absorción en un cultivo celular (Nobile et al., 2016). En consecuencia, en el presente estudio, la inclusión de HSP aumentó el nivel de expresión de tripsina y quimotripsina en los ciegos pilóricos e intestino anterior, lo cual podría estar asociado con el alto nivel de péptidos en HSP. Por otra parte, Lilleeng et al. (2007), encontraron que el tejido pancreático del salmón del Atlántico alimentado con una dieta con SBM, los componentes anti nutricionales en la soya pudieron regular de manera positiva la expresión génica de la tripsina. Estos hallazgos de cierta forma apoyan estudios previos en los que bajas cantidades de sustancias alergénicas en proteínas vegetales pueden provocar

reacciones de hipersensibilidad ligadas a la expresión de genes en el tracto digestivo de los peces (Tacchi et al., 2012).

Existe escaso conocimiento sobre los efectos de la harina de larvas *H. illucens* sobre las enzimas digestivas de los peces (Guerreiro et al., 2020b). En el presente estudio, la expresión de tripsina y quimotripsina no presentó una diferencia significativa entre los tratamientos al reemplazar a harina de pescado por BSFLM. Sin embargo, los patrones de expresión génica de estas enzimas entre los tratamientos dietarios coinciden con las tendencias de crecimiento. En este sentido, aparentemente existe una coincidencia entre los cambios en la expresión del ARNm y la respuesta del crecimiento de *T. macdonaldi*. Esto puede indicar que los juveniles de *T. macdonaldi* son susceptibles a BSFLM, ya que posiblemente contiene algunos compuestos tóxicos que fueron adversos para la totoaba. En estudios previos, se ha sugerido que es perjudicial el exceso de quitina en los productos de *H. illucens* (Kroeckel et al., 2012; Guerreiro et al., 2020a; Fischer et al., 2022); por lo tanto, los hallazgos de este estudio podrían apoyar este concepto dado que no fueron exitosos los reemplazos de 25 y 40% de harina de pescado por BSFLM en dietas para totoaba.

IV. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos determinaron que el peso molecular de tripsina y quimotripsina de *Totoaba macdonaldi* fueron de 24.1 y 25.9 kDa, respectivamente.
- La temperatura óptima de actividad de tripsina y quimotripsina fue de 65°C y 45°C respectivamente y a un pH óptimo de 8.0.
- Los pesos moleculares, temperatura y pH óptimos para la actividad enzimática de tripsina y quimotripsina de totoaba son semejantes a otras especies de peces marinos y de agua dulce.
- Las mezclas de *Arthrospira* sp. y SPC, pueden sustituir al menos 33% de harina de pescado en la dieta de juveniles de totoaba, sin afectar negativamente el crecimiento o la supervivencia.
- Los peces alimentados con la mezcla que contenía principalmente harina de sangre se desempeñaron pobremente.
- En este estudio y bajo estas condiciones experimentales, el 100% del reemplazo de la harina de pescado no es viable con ninguna de las dietas probadas, como lo indican las mortalidades en masa observadas.
- Juveniles de totoaba alimentados con proteína de soya hidrolizada a un nivel de reemplazo del 15% de harina de pescado tuvieron un desempeño en crecimiento, supervivencia y utilización del alimento adecuado y semejante con respecto a los peces alimentados con la dieta control.
- El reemplazo del 25 o 40% de la harina de pescado por harina de larvas de la mosca soldado negro no tuvo éxito. Sin embargo, la totoaba puede tolerar niveles inferiores al 25% de la harina de larvas de *Hermetia illucens*, tal vez incorporando previamente un tratamiento de hidrólisis para la harina de larvas, lo cual vale la pena investigar más a fondo.
- Los resultados de esta investigación proporcionan información esencial que promueve el uso de fuentes alternativas de proteínas mixtas para el reemplazo de la harina de pescado para esta especie, logrando un avance de información para una futura investigación sobre este tema.

V. RECOMENDACIONES

- Purificar tripsina y quimotripsina mediante métodos cromatográficos con el fin de estudiar su forma pura en relación a su estructura molecular, características funcionales y potencial bioquímico.
- Las enzimas (tripsina y quimotripsina) presentes en el tracto digestivo de totoaba deben recuperarse en su forma activa y estable para su posterior uso comercial.
- Realizar evaluaciones del sistema digestivo, como el análisis del hígado y las alteraciones morfológicas del intestino anterior, medio y posterior mediante técnicas histológicas, con el propósito de evaluar posibles influencias de los distintos ingredientes proteicos.
- No descartar el uso de menores niveles (< 25%) de reemplazo de harina de pescado por harina de larvas de *Hermetia illucens* como una opción para la elaboración de dietas para juveniles de *Totoaba macdonaldi*.
- Incorporar un tratamiento de hidrólisis para la harina de larvas de la mosca soldado negro (*H. illucens*) para mejorar el balance de nutrientes y aspectos físicos de las dietas, con lo cual podría mejorar los resultados en términos de los parámetros de crecimiento de totoaba.

VI. LITERATURA CITADA

- Abery, N.W., Gunasekera, R.M., De Silva, S.S., 2002. Growth and nutrient utilization of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) fingerlings fed diets with varying levels of soybean meal and blood meal. *Aquac. Res.* 33, 279-289.
- Agboola, J.O., Teuling, E., Wierenga, P.A., Gruppen, H., Schrama, J.W., 2019. Cell wall disruption: An effective strategy to improve the nutritive quality of microalgae in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquac. Nutr.* 25, 783-797.
- Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, J.P., Holt, G.J. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiol. Biochem.* 25, 291-300
- Arriaga-Hernández, D., Hernández, C., Martínez-Montaño, E., Ibarra-Castro, L., Lizárraga-Velázquez, E., Leyva-López, N., Chávez-Sánchez, M.C., 2021. Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for white snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture* 530, 735823.
- Badillo-Zapata, D., Lazo, J.P., Herzka, S.Z., Viana, M.T., 2014. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquac. Res.* 47, 1778-1789.
- Bandara, T., 2018. Alternative feed ingredients in aquaculture: opportunities and challenges. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 3087-3094.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L.M., Pérez-Jiménez, A., Peres, H., 2014. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 170, 18-25.
- Belghit, I., Liland, N.S., Gjesdal, P., Biancarosa, I., Menchetti, E., Li, Y., Waagbø, R., Krogdahl, Å., Lock, E.J., 2019. Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 503, 609-619.
- Bureau, D. 2011. Better defining nutritional requirements of fish and the nutritive value of feed ingredients: Lessons from integration of experimental data from a wide variety of sources. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola Xi. Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23 al 25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N.L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 978-607-433-775-4. pp. 1-11.
- Caimi, C., Renna, M., Lussiana, C., Bonaldo, A., Gariglio M., Meneguz, M., Dabbou, S., Schiavone, A., Gai, F., Elia, A.C., Prearo, M., Gasco, L., 2020. First insights on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal dietary administration in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) juveniles. *Aquaculture* 515, 734539.

- Cai, Z., Li, W., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Ai, Q., 2015. Effects of dietary size-fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. *Aquaculture* 440, 40-47.
- Daniel, N., 2018. A review on replacing fish meal in aqua feed using plant protein sources. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 6, 164-179.
- Davis, D.A., Gatlin III, D.M., 1996. Dietary mineral requirements of fish and marine crustaceans. *Rev. Fish. Sci.* 4, 75-99.
- Debnath, S., Saika, S.K., 2021. Absorption of protein in teleosts: a review. *Fish Physiol Biochem* 47, 313-326.
- Desjardins, L.M., Hicks, B.D., Hilton, J.W., 1987. Iron catalyzed oxidation of trout diets and its effect on the growth and physiological response of rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 3, 173-182.
- Eryalçın, K., M., Yildiz, M. 2015. Effects of long-term feeding with dried microalgae added microdiets on growth and fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 15, 905-915.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy (ISBN 978-92-5-130562-1).
- Finke, M.D., 2013. Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biol.* 32, 27-36.
- Fischer, H., Romano, N., Renukdas, N., Kumar, V., Kumar Sinha, A., 2022. Comparing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae versus prepupae in the diets of largemouth bass, *Micropterus salmoides*: Effects on their growth, biochemical composition, histopathology, and gene expression. *Aquaculture* 546, 737323.
- Fisher, H.J., Collins, S.A., Hanson, C., Mason, B., Colombo, S.M., Anderson, D.M., 2020. Black soldier fly larvae meal as protein source in low fish meal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 521, 734978.
- Fuentes-Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso, A.N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J.P., Mata-Sotres, J.A., 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture* 495, 78-89
- Gatlin, D.M.III., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogh, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, 551-579.
- García-Ortega, A., Kissinger, K.R., Trushenski, J.T. 2016. Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from *Schizochytrium limacinum* in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture* 452, 1-8.
- Gasco, L., Biasato, I., Dabbou, S., Schiavone, A., Gai, F., 2019. Animals fed insect-based diets: State-of-the-art on digestibility, performance and product quality. *Animals* 9, 170-201.

- González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M., Bringas-Alvarado, L., Navarro-García, G. 2011. Fish oil replacement, by-products utilization in aquafeeds, and prospective species for mariculture development in Sonora: A review of research in Aquaculture Nutrition at the University of Sonora. 247-256 pp. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola Xi. Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23 al 25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N.L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Guerreiro, I., Castro, C., Antunes, B., Coutinho, F., Rangel, F., Couto, A., Serra, C.R., Peres, H., Pousão-Ferreira, P., Matos, E., Gasco, L., Gai, F., Corraze, G., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2020a. Catching black soldier fly for meagre: growth, whole-body fatty acid profile and metabolic responses. *Aquaculture* 734613.
- Guerreiro, I., Serra, C.R., Coutinho, F., Couto, A., Castro, C., Rangel, F., Peres, H., Pousão-Ferreira, P., Matos, E., Gasco, L., Gai, F., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2020b. Digestive enzyme activity and nutrient digestibility in meagre (*Argyrosomus regius*) fed increasing levels of black soldier fly meal (*Hermetia illucens*). *Aquac. Nutr.* 27, 142-152.
- Hardy, R.W., 2006. Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture. Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D.A., Puello-Cruz, A.C., García-Ortega, A. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. 15-17 Noviembre, ISBN 970-694-333-5. pp. 396-409.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., Wu, G., 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J. Anim. Sci. Biotech.* 8, 1-23.
- Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J.M., 2019. The future of aquatic protein: Implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth* 1, 316-329.
- Jesús-de la Cruz, K., Álvarez-González, C. A., Peña, E., Morales-Contreras, J. A., & Ávila-Fernández, Á. (2018). Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production. *3 Biotech*, 8(4).
- Jiang, Y.B., Yin, Q.Q., Yang, Y.R., 2009. Effect of soybean peptides on growth performance, intestinal structure and mucosal immunity of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93, 754-760.
- Jobling, M., 2016. Fish nutrition research: Past, present and future. *Aquac. Int.* 24, 767-786
- Kader, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Bulbul, M., Honda, Y., Mamauag, R.E., Laining, A., 2011. Growth, nutrient utilization, oxidative condition, and element composition of juvenile red sea bream *Pagrus major* fed with fermented soybean meal scallop by-product blend as fishmeal replacement. *Fish. Sci.* 77, 119-128.

- Karapanagiotidis, I., Daskalopoulou, E., Vogiatzis, I., Rumbos, C., Mente, E., Athanassiou, C., 2014. Substitution of fishmeal by fly *Hermetia illucens* prepupae meal in the diet of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydro* 110-114.
- Kasumyan, A.O., Doving, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. *Fish and Fisheries*. 4, 289-347.
- Kortner, T.M., Overrein, I., Oie, G., Øie, G., Kjørsvik, E., Arukwe, A., 2011. The influence of dietary constituents on the molecular ontogeny of digestive capability and effects on growth and appetite in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 315, 114-120.
- Kroeckel, S., Harjes, A.-G.E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A., Schulz, C. 2012. When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute – Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364, 345-352.
- Kumar, V., Sakhawat Hossain, M., Ragaza, J.A., Rubio Benito, M., 2020b. The potential impacts of soy protein on fish gut health, in: Soybean for human consumption and animal feed. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92695>.
- Kumari, S., Annamareddy, S.H.K., Abanti, S., Rath, P.K., 2017. Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *Int. J. Biol. Macromol.* 104, 1697-1705.
- Kurtovic I., Marshall S.N., Simpson B.K. 2006. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) *Comp. Biochem. Physiol.*143B:432–440.
- Lall, S.P. 2002. The minerals. In: Halver, J.E., Harvey, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press. Amsterdam, The Netherlands, pp. 259-308.
- Lazo, J. P., Mendoza, R., Holt, G. J., Aguilera, C., & Arnold, C. R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265(1-4), 194–205.
- Lekang, O.I. 2015. Feeding equipment. In: Davis D.A. (Ed.) *Feed and feeding practice in aquaculture*. Cambridge Woodhead Publishing; pp. 349-367.
- Li, S., Ji, H., Zhang, B., Zhou, J., Yu, H., 2017. Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. *Aquaculture* 477, 62-70
- Lilleeng, E., Froystad, M.K., Ostby, G.C., Valen, E.C., Krogdahl, A., 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 147, 25-36.
- Lock, E.R., Arsiwalla, T., Waagbo, R., 2016. Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postmolt. *Aquac. Nutr.* 22, 1202-1213.

- Lu, R., Chen, Y., Yu, W., Lin, M., Yang, G., Qin, C., Meng, X., Zhang, Y., Ji, H., Nie, G., 2020. Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal can replace soybean meal in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diets.
- Mamauag, R.E.P., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Gao, J., Nguyen, B.T., Ragaza, J.A., 2011. Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 321, 252-258.
- Mata-Sotres, J.A., Lazo, J.P., Baron-Sevilla, B., 2015. Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture* 437, 292-296.
- McGoogan, B.B., Gatlin, D.M., 1997. Effects of replacing fish meal with soybean meal in diets for red drum *Sciaenops ocellatus* and potential for palatability enhancement. *J. World. Aquacult. Soc.* 28, 374-385.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393-4412.
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M., 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture* 362-363, 50-54.
- Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Gallardo-Álvarez, F.J., Estruch, G., Godoy-Olmos, S., Jover-Cerdá, M., Martínez-Llorens, S., 2018. Partial and total replacement of fishmeal by a blend of animal and plant proteins in diets for *Seriola dumerili*: Effects on performance and nutrient efficiency. *Aquac. Nutr.* 24, 1163-1174.
- Morais, S. 2016. The physiology of taste in fish: Potential implications for feeding stimulation and gut chemical sensing. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 25, 133-149.
- Nairuti, R. N., Musyoka, S.N., Yegon, M.J., Opiyo, M.A., 2021. Utilization of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae as a Protein Source for Fish Feed-a Review. *Aqua. St.* 22, AQUAST697.
- Nandeesh, M.C., Gangadhara, B., Manissery, J.K., Venkataraman, L.V., 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 80, 117-120.
- Nates, S.F. 2016. *Aquafeed Formulations*. (Ed. Nates, S.F.) 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 1-12.
- Nobile, V., Duclos, E., Michelotti, A., Bizzaro, G., Negro, M., Soisson, F., 2016. Supplementation with a fish protein hydrolysate (*Micromesistius poutassou*): effects on body weight, body composition, and CCK/GLP-1 secretion. *Food Nutr. Res.* 60, 29857
- Nogales-Mérida, S., Gobbi, P., Józefiak, D., Mazurkiewicz, J., Dudek, K., Rawski, M., Kierończyk, B., Józefiak, A., 2019. Insects meals in fish nutrition. *Rev. Aquac.* 11, 1080-1103.
- National Research Council (NRC), 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington, D. C. <https://doi.org/10.17226/130.39>

- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H., 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. In: Davis D.A. (Ed.), *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Woodhead Publishing, Waltham, MA, USA pp. 203-233.
- Perez-Velazquez, M., Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L., 2017. Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization, and body composition of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890). *Aquac. Res.* 48, 2607-2617.
- Perez-Velazquez, M., Gatlin III, D.M., González-Félix, M.L., García-Ortega, A., 2018. Partial replacement of fishmeal and fish oil by algal meals in diets of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 487, 41-50.
- Perez-Velazquez, M., Gatlin III, D.M., González-Félix, M.L., García-Ortega, A., de Cruz, C.R., Juárez-Gómez, M.L., Chen, K., 2019. Effect of fishmeal and fish oil replacement by algal meals on biological performance and fatty acid profile of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂). *Aquaculture* 507, 83-90.
- Renna, M., Schiavone, A., Gai, F., Dabbou, S., Lussiana, C., Malfatto, V., Prearo, M., Capucchio, M.T., Biasato, I., Biasibetti, E., De Marco, M., Brugiapaglia, A., Zoccarato, I., Gasco, L., 2017. Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 957-969.
- Rossi, W., Tomasso, J.R., Gatlin, D.M. 2015. Production performance and non-specific immunity of cage-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*, fed soybean-based diets. *Aquaculture* 443, 84-89.
- Rossi, W., Newcomb, M., Gatlin, D.M. 2017. Assessing the nutritional value of an enzymatically processed soybean meal in early juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquaculture* 467, 94-101.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A., Waagbø, R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Fish Physiol. Biochem.* 32, 7-23.
- Rust, M.B., 2002. Nutritional physiology. In: Halver, J.E., Harvey, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press. Amsterdam, The Netherlands, pp. 367-452.
- Santos, W.M., Costa, L.S., López-Olmeda, J.F., Costa, N.C.S., Santos, F.A.C., Oliveira, C.G., Guilherme, H.O., Bahiense, R.N., Luz, R.K., Ribeiro, P.A.P., 2020. Dietary protein modulates digestive enzyme activities and gene expression in red tilapia juveniles. *Animal*, 1-9.
- Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M.A., Parsaeimehr, A., Lang, Y., Daroch, M., 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *J. Appl. Physiol.* 30, 197-213.
- Shahidi, F., Janak Kamil, T.V.A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 435-64.

- Sili., C., Torzillo, G., Vonshak, A., 2012. *Arthrospira* (Spirulina). In: Ecology of Cyanobacteria II. Their diversity in space and time. Whitton, B.A. (Ed.). Springer, Netherlands, Dordrecht. 677-705.
- Singh, B.P., Vij, S., Hati, S., 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54, 171-179.
- Simpson, B.K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. In: Seafood enzymes (Eds. Haard N.& Simpson B.). Marcel Dekker, New York, pp 191–213.
- Song, Z., Li, H., Wang, J., Li, P., Sun, Y., Zhang, L., 2014. Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 426-427, 96-104.
- Song, Z., Li, P., Wang, J., Huang, B., Li, B., Wang, S., Zhang, Y., Gong, X., Li, X., Tan, Q., 2016. Effects of seaweed replacement by hydrolyzed soybean meal on growth, metabolism, oxidation resistance and body composition of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* 463, 135-144.
- Sprague, M., Walton, J., Campbell, P.J., Strachan, F., Dick, J.R., Bell, J.G. 2015. Replacement of fish oil with DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-molts. *Food chem.* 185, 413-421.
- Scopes RK. 2002. Enzyme activity and assays. *Encyclopedia of life sciences*. London (UK): John Wiley & Sons, Ltd.; p. 1–6.
- Soetemans, L. Uyttebroek, M., Bastiaens, L., 2020. Characteristics of chitin extracted from black soldier fly in different life stages. *Int. J. Biol. Macromol.* 165, 3206-3214.
- Solovyev MM, Izvekova GI, Kashinskaya EN, Gisbert E. 2018. Dependence of pH values in the digestive tract of freshwater fishes on some abiotic and biotic factors. *Hydrobiologia.* 807:67–85.
- Sunde, J., Eiane, S.A., Rustad, A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygård, E., Venturini, G., Rungruangsak-Torrissen, K., 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquac. Nutr.* 10, 216-277.
- Surendra, K.C., Tomberlin, J.K., van Huis, A., Cammack, J.A., Heckmann, L.H.L., Khanal, S.K., 2020. Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Management*, 117, 58-80.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Metian, M., 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans - trends and prospects. In: Fisheries and Aquaculture Technical Paper. vol. 564 Food and Agriculture Organization, Rome, Italy (87 pp.).
- Tacchi, L., Secombes, C.J., Bickerdike, R., Adler, M.A., Venegas, C., Takle, H., Martin, S.A.M. 2012. Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant

- proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Genomics 13, 363.
- Teuling, E., Schrama, J.W., Gruppen, H., Weirenga, P.A., 2017. Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). Aquaculture 479, 490-500.
- Torrecillas, S., Mompel, D., Caballero, M.J., Montero, D., Merrifield, D., Rodiles, A., Robaina, L., Zamorano, M.J., Karalazos, V., Kaushik, S., Izquierdo, M. 2017. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 468, 386-398.
- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M.A., Flores-Ibarra, M., Álvarez-González, C.A., López, L.M., 2017. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the hematological and biochemistry parameters. Aquac. Res. 48, 4038-4057.
- Tschirner, M., Simon, A., 2015. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. J. Insects Food Feed 1, 249-259.
- Uczay, J., Battisti, E.K., Lazzari, R., Pessatti, M.L., Staudt Schneider, T.L., Hermes, L.B., Peixoto, N.C., Perez Fabregat, T.E.H., 2019. Fish meal replaced by hydrolysed soybean meal in diets increases growth and improves the antioxidant defense system of silver catfish (*Rhamadia quelen*). Aquac. Res. 50, 1438-1447.
- Viana, M.T., Rombenso, A. N., Del Rio-Zaragoza, O.B., Nomura, M., Díaz-Argüello, R., Mata-Sotres, J.A., 2019. Intestinal impairment of the California yellowtail, *Seriola dorsalis*, using soybean meal in the diet. Aquaculture 513, 734443.
- Villanueva-Gutiérrez, E., Maldonado-Othón, C.A., Perez-Velazquez, M., González-Félix, M.L., 2020a. Activity and partial characterization of trypsin, chymotrypsin and lipase in the digestive tract of *Totoaba macdonaldi*. J. Aquat. Food Prod. Technol. 29, 322-334.
- Villanueva-Gutiérrez, E., González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Perez-Velazquez, M., 2020b. Use of alternative plant and animal protein blends, in place of fishmeal, in diets for juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi*. Aquaculture 529, 735698.
- Wallace, P., Yang, L., 2010. Soybean peptide as additive on yellow feather broiler chicks: nutritional and biochemical profiles. J. Gahana Sci. Assoc. 12, 59-67.
- Walker, A.B., Berlinsky, D.L., 2011. Effects of partial replacement of fish meal protein by microalgae on growth, feed intake, and body composition of Atlantic cod. N. Am. J. Aquac. 73, 76-83
- Wang, G., Peng, K., Hu, J., Yi, C., Chen, X., Wu, H., Huang, Y., 2019. Evaluation of defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as an alternative protein ingredient for juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) diets. Aquaculture 507, 144-154.

- Wu, Y.B., Ren, X., Chai, X.J., Li, P., Wang, Y., 2018. Replacing fish meal with a blend of poultry by-product meal and feather meal in diets for giant croaker (*Nibea japonica*). *Aquac. Nutr.* 24, 1085-1091
- Yaghoubi, M., Mozanzadeh, M.T., Marammazi, J.G., Safari, O., and Gisbert, E. 2016. Dietary replacement of fish meal by soy products (soybean meal and isolated protein) in silvery-black porgy juveniles (*Sparidentex hasta*). *Aquaculture.* 464: 50–59.
- Yuan, X. Jiang, G. Cheng, H., Cao, X., Wang, C., Dai, Y., Liu, W. 2020. Replacing fishmeal with cottonseed meal protein hydrolysate affects growth, intestinal function, and growth hormone/insulin-like growth factor I axis of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *J. World Aquacult. Soc.* 51, 1235-1249.
- Yúfera, M., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G., 2018. The digestive function in developing fish larvae and fry. From molecular gene expression to enzymatic activity. In: Yúfera, M. (Ed.), *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer International Publishing AG, Cham, pp. 51-86.
- Zarantoniello, M., Randazzo, B., Secci, G., Notarstefano, V., Giorgini, E., Lock, E.J., Olivotto, I., 2021. Application of laboratory methods for understanding fish responses to black soldier fly (*Hermetia illucens*) based diets. *J. Insects Food Feed.* In press.
- Zhou, L., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S., Dave, D., 2011a. Extraction, purification and characterization of fish chymotrypsin: A review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 7: 104–123.
- Zhou, S.F., Sun, Z.W., Ma, L.Z., Yu, J.Y., Ma, C.S., Ru, Y.J., 2011b. Effect of feeding Enzymolytic soybean meal on performance, digestion and immunity of weaned pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24, 103-109.