



# UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCENCIAS

---

## EVALUACIÓN DE FUENTES DE LÍPIDO DE ORIGEN VEGETAL, ANIMAL Y MICROALGAL PARA EL REEMPLAZO DE ACEITE DE PESCADO Y SU EFECTO SOBRE LIPASAS PANCREÁTICAS EN JUVENILES DE TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*)

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

CARLOS ALBERTO MALDONADO OTHÓN

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 FUENTES DE LÍPIDO DE ORIGEN VEGETAL, ANIMAL Y  
MICROALGAL PARA EL REEMPLAZO DE ACEITE DE PESCADO Y SU EFECTO  
SOBRE LIPASAS PANCREÁTICAS EN JUVENILES DE TOTOABA (*Totoaba  
macdonaldi*)

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCIENCIAS

presenta:

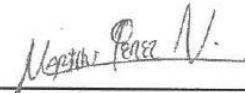
CARLOS ALBERTO MALDONADO OTHÓN

## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “EVALUACIÓN DE FUENTES DE LÍPIDO DE ORIGEN VEGETAL, ANIMAL Y MICROALGAL PARA EL REEMPLAZO DE ACEITE DE PESCADO Y SU EFECTO SOBRE LIPASAS PANCREÁTICAS EN JUVENILES DE TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*)” presentada por Carlos Alberto Maldonado Othón, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias con especialidad en acuicultura.



\_\_\_\_\_  
Dra. Mayra Lizett González Félix  
Director



\_\_\_\_\_  
Dr. Martín Pérez Velázquez  
Co-director



\_\_\_\_\_  
Dr. Enrique De la Re Vega  
Sinodal interno



\_\_\_\_\_  
Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro  
Sinodal interno



\_\_\_\_\_  
Dr. Delbert M. Gatlin, III  
Sinodal externo

## **DEDICATORIA**

A mi abuela Margarita Encinas Peralta†:

Gracias por tu crianza y enseñanzas, fuiste pilar para alcanzar todas mis metas, te sigo extrañando cada día, pero sé que siempre me cuidas y estás conmigo. Este logro va dedicado para ti, porque tu iniciaste mi educación enseñándome a leer y escribir como el primer ladrillo y con este título concluye la formación que tu iniciaste, no tengo duda que serías la más feliz por mí, gracias nana magui.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora, al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y al Posgrado en Biociencias por todo el apoyo brindado durante esta etapa en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico durante mi estancia en este programa de doctorado.

El más profundo agradecimiento a mis asesores la Dra. Mayra Lizett González Félix y al Dr. Martín Pérez Velázquez, al ser claves en mi proceso de formación académica, ya que me han brindado su apoyo incondicional desde la licenciatura hasta el doctorado, gracias por creer en mi como su alumno, cuidarme y hacerme crecer como profesionista y persona. Dra. Mayra gracias por influenciarme a ser un amante de los lípidos en nutrición acuícola.

A mis sinodales internos, el Dr. Enrique De la Re Vega y la Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro, por todo su apoyo, enseñanzas y recomendaciones en base a la mejora de mi proyecto doctoral, agradecido infinitamente.

To Dr. Delbert M. Gatlin III, for all the help and support throughout my doctoral research. I really appreciate all the advices and recommendations in order to improve my research. It has been a great experience collaborate with you, it has allowed me to grow, thanks for your patience and efforts during this time.

A la Dra. Chrystian Mariana Rodríguez Armenta por todo su apoyo y ayuda en nuestros análisis de biología molecular, sin importar la hora o el día de la semana, agradecido totalmente por todos sus consejos y enseñanzas.

Al personal que labora en DICTUS y en la Unidad Experimental Kino (UEK) por todo el apoyo que me brindaron durante este tiempo, Jesús Vázquez, Fulgencio García, Polo Encinas, Ulises Becerra, Marco Esquer, Francisco León, Edgar Sabino León, Javier, Abelardo, Cesar, don Gaby.

A mis padres Osvelia Othón Encinas y Bernardo Maldonado Calvario, gracias por todo su apoyo y cariño, por siempre estar como mis pilares y ser mi ejemplo a seguir. A mis hermanos, Diana, Berna y Erasto por siempre apoyarme y crecer juntos, eternamente agradecido por tener los mejores hermanos que pueden existir. A mis sobrinas Margarita y Nicole por ser la alegría de nuestras vidas. Gracias a mi tía María Teresa Othón, por apoyarme siempre como una segunda madre.

A mi novia Lyra Duarte Rodríguez, gracias por siempre estar a mi lado queriéndome y apoyándome, por la paciencia y por creer en mí. Eternamente agradecido, sin ti no hubiera podido alcanzar mis metas, gracias, te amo.

A mis compañeros de laboratorio Carolina De la Re, Hugo Cañedo, Michel Millanes y especialmente a Emmanuel Villanueva por que crecimos juntos durante este proceso doctoral, gracias por todo el apoyo, amistad y ayuda.

A mis amigos, Christian Minjarez, María Luisa Juárez, por toda su amistad, apoyo académico, ayuda y enriquecimiento a mi formación. Además, a mis amigos Julio Vega, Ilse Bayliss, Lluvia Rodríguez, Abraham López, Dulce Ruíz, Sergio González, Luis González, Pedro Murrieta, Roberto Acuña, Fabián Urbalejo, Rommel Valero, Gregorio Quijada, Juan Guerra, Jorge Chairez y Cuauhtémoc Nieblas, por su gran amistad y apoyo.

Finalmente, un agradecimiento a mí mismo por creer en mí, por tener la fuerza, determinación, convicción y no dejarme caer en los momentos difíciles, por todas esas horas de esfuerzo y trabajo duro, cansancio, estrés y decepciones que al final de cuentas sirvieron para lograr este objetivo, gracias.

## RESUMEN

La totoaba *Totoaba macdonaldi* es un pez marino carnívoro de rápido crecimiento, endémico del Golfo de California, México, lugar donde recientemente se ha iniciado su cultivo a escala comercial. La tendencia actual en nutrición acuícola es la búsqueda de fuentes alternativas de lípido sustentables y económicamente viables para disminuir el uso de aceite de pescado (AP) en alimentos balanceados para peces, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar lípidos de origen vegetal, animal y microalgal y su efecto sobre lipasas pancreáticas del tracto digestivo, crecimiento, composición proximal y perfil de ácidos grasos en juveniles de totoaba. El proyecto se dividió en tres trabajos de investigación; el primero consistió en la caracterización parcial de lipasas pancreáticas en el tracto digestivo, resultando en la detección de dos lipasas de 70.2 y 47.5 kDa, se consideró que pudieran ser la forma no activa y la forma final de la lipasa pancreática dependiente de colipasa por no detectar actividad en presencia de sales biliares. La segunda investigación evaluó el uso de aceite de soya (AS) y dos harinas derivadas de microalga *Schizochytrium limacinum* (SL1 y SL2) para reemplazar el 33%, 66% y 100% de AP en dietas para juveniles de totoaba; después de 6 semanas de experimentación los resultados indicaron que hasta el 100% de AP puede ser reemplazado por harinas de *S. limacinum*, promoviendo una mejora en el crecimiento, preservando el valor nutricional del filete y los beneficios en la salud para el consumidor humano, además, se observó que la concentración de la lipasa pancreática con peso molecular de 70.2 kDa disminuyó conforme aumentó el nivel de reemplazo de AP. Por último, la tercera investigación consistió en la evaluación de los aceites de larva de la mosca soldado negro *Hermetia illucens* y camelina *Camelina sativa* para reemplazar 30% y 60% de AP en alimentos para juveniles de totoaba durante 7 semanas. Los resultados indicaron que hasta el 30% de AP puede ser sustituido satisfactoriamente por aceite de larva de *H. illucens*, con un filete resultante de alta calidad nutricional que provee 284 mg de DHA + EPA por cada 100 g, suficiente para satisfacer el consumo diario recomendado en adultos. Adicionalmente, se confirmó la presencia de las lipasas dependiente de sales biliares y dependiente de colipasa por primera vez en el tracto digestivo de *T. macdonaldi*, sin embargo, la expresión génica de ambas lipasas no fue significativamente afectada a nivel transcripcional por los diferentes tratamientos bajo las condiciones experimentales de ese trabajo.



## ABSTRACT

Totoaba, *Totoaba macdonaldi*, is a newly cultured fast-growing marine carnivorous fish endemic to the Gulf of California, Mexico. The current trend in aquaculture nutrition is to look for sustainable and economically viable alternative sources of lipids in order to minimize the use of fish oil (FO) in aquafeeds for fish; hence, the objective of this work was to evaluate vegetable, animal and microalgal lipid sources to replace FO in formulations for juvenile totoaba and their effect on pancreatic lipases in the digestive tract, growth performance, proximate and fatty acid compositions of fish tissues. The current project was divided into 3 research studies; the first consisted in the partial characterization of lipases within the gastrointestinal tract, which resulted in the detection of 2 pancreatic lipases of 70.2 and 47.5 kDa, considering they could be the uncleaved and the final form of the colipase-dependent pancreatic lipase because no activity was detected in the presence of bile salts. In the second study, the use of soybean oil and two microalgal meals obtained from *Schizochytrium limacinum* were evaluated in replacement of 33%, 66% and 100% of FO in diets for juvenile *T. macdonaldi*; after 6 weeks of conducting this trial, results indicated that up to 100% of FO could be replaced by the *S. limacinum* meals, improving fish growth and preserving the nutritional value and health benefits of the fillet for human consumption; moreover, concentration of the pancreatic lipase with molecular weight of 70.2 kDa decreased in the digestive tract as the level FO replacement increased in the diets. Finally, the third study consisted in the evaluation of camelina, *Camelina sativa*, and black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, oils to replace 30 and 60% of FO in aquafeeds for totoaba during 7 weeks. Results indicated that up to 30% of FO could be successfully replaced with *H. illucens* larvae oil, producing a fillet with high nutritional quality for human consumption which provides 284 milligrams of DHA + EPA in a 100 g fillet, enough to cover the recommended daily intake for adults. In addition, the presence of bile salt-dependent and colipase-dependent lipases within the gastrointestinal tract of *T. macdonaldi* was confirmed for the first time, however, their gene expression was not significantly affected at a transcriptional level by the different treatments under these experimental conditions.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES.....	2
II. JUSTIFICACIÓN.....	5
III. HIPÓTESIS.....	6
IV. OBJETIVOS.....	7
4.1. Objetivo general.....	7
4.2. Objetivos particulares.....	7
V. ARTÍCULOS PUBLICADOS Y SOMETIDOS.....	8
5.1. Activity and partial characterization of trypsin, chymotrypsin, and lipase in the digestive tract of <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	9
5.2. Replacement of fish oil by soybean oil and microalgal meals in diets for <i>Totoaba macdonaldi</i> (Gilbert, 1890) juveniles.....	10
5.3. Replacement of fish oil by camelina and black soldier fly larvae oils in diets for juvenile <i>Totoaba macdonaldi</i> , and their effect on growth, fatty acid profile, and gene expression of pancreatic lipases.....	11
VI. DISCUSIÓN.....	12
VII. CONCLUSIONES.....	21
VIII. RECOMENDACIONES.....	23
IX. LITERATURA CITADA.....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Lista de artículos publicados y enviados durante el periodo..... 2017-2021.	8

## INTRODUCCIÓN

La totoaba, *Totoaba macdonaldi*, es un pez marino carnívoro endémico del Golfo de California, México, que se destaca como un excelente candidato para la acuicultura debido a la alta calidad de su carne y a su rápido crecimiento; puede alcanzar hasta 2.7 kg de peso en el periodo de un año al ser cultivado en jaulas sumergibles (Juárez *et al.*, 2016). Para lograr una producción exitosa de acuicultura de peces marinos como la totoaba en México es fundamental el desarrollo de alimentos balanceados que satisfagan sus requerimientos nutricionales. Los lípidos dietarios son uno de los nutrientes más importantes incorporados en alimentos balanceados para peces marinos debido a su importancia como fuente de energía, componentes estructurales de membranas celulares y fuente de ácidos grasos esenciales (Turchini *et al.*, 2009).

Históricamente el aceite de pescado ha sido la fuente de lípido ideal en la formulación de alimentos balanceados, esto debido a su alta digestibilidad, palatabilidad y ausencia de factores antinutrientes, además de su riqueza en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA, 20:6n-3) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), que son nutrientes determinantes para promover un buen crecimiento, salud y calidad nutricional del filete en organismos cultivados (Tocher, 2003; Barrows *et al.*, 2008; Turchini *et al.*, 2009). Estos ácidos grasos son altamente apreciados y recomendados para consumo por el ser humano debido a su rol benéfico en la prevención de enfermedades neurológicas, cardiovasculares e inflamatorias (Swanson *et al.*, 2012; Calder, 2014). Sin embargo, a pesar de los grandes beneficios que el aceite de pescado representa, su utilización se ha tornado ambientalmente y económicamente insostenible debido a su alto costo e impacto ecológico, por lo que reducir la inclusión de este insumo en formulaciones se ha convertido en una prioridad y la investigación de fuentes alternativas de lípido se ha convertido en una necesidad para asegurar la sustentabilidad de la actividad acuícola a futuro (Hixon y Parrish, 2014; Tocher *et al.*, 2019). Entre las opciones para reemplazo de AP se encuentran aceites de origen vegetal, animal, de insecto o de microalgas, todas ellas están siendo evaluadas en alimento balanceado para diferentes especies de peces cultivados.

## I. ANTECEDENTES

Los aceites vegetales (AV) como el de soya (AS) y camelina (AC) se han evaluado como alternativas prometedoras para el remplazo del aceite de pescado, debido a que su producción ha incrementado, lo que se traduce en una mayor disponibilidad y un menor costo comparado con el aceite de pescado (Nasopoulou y Zabetakis, 2012). El AS ha sido ampliamente estudiado en acuicultura debido a su atractivo costo y disponibilidad, es caracterizado por su rico contenido en ácido linoleico (18:2n-6). Estudios previos han demostrado buenos resultados en crecimiento al reemplazar AP con AS en otras especies de sciánidos como *Larimichthys crocea* (Duan *et al.*, 2014), *Cynoscion parvipinnis* (González-Félix *et al.*, 2016) y *Argyrosomus regius* (Emre *et al.*, 2016). Por otra parte, el AC puede ser producido todo el año y tiene un precio considerablemente bajo. Este lípido se caracteriza por su alto contenido (30-45% del total de AG) de ácido alfa-linolénico (18:3n-3) perteneciente a la familia omega-3, característica deseable en formulaciones para peces marinos (Ní Eidhin *et al.*, 2003; Abramovič and Abram, 2005). El AC se ha probado con resultados favorables en crecimiento en otras especies de peces marinos tales como *Gadus morhua* (Morais *et al.*, 2012), gilthead seabream *Sparus aurata* (Huyben *et al.*, 2020) y *Pagrus major* (Mzengereza *et al.*, 2021). En dichos estudios, aunque no se afectó el crecimiento, si se observó una reducción en las concentraciones de 22:6n-3 y 20:5n-3 en los peces debido a la deficiencia de este tipo de ácidos grasos (AG) en los AV, lo que puede afectar la calidad final del filete y su valor nutricional para el consumidor humano. Sin embargo, en los peces alimentados con AC se observó un incremento de 18:3n-3, lo que ayudó a mitigar la pérdida de las características nutritivas del filete, ya que este AG es esencial en la nutrición humana (Köse y Yildiz, 2013; Nguemeni *et al.*, 2013).

Las microalgas se destacan como un grupo prometedor para proveer a la industria acuícola de lípidos de alta calidad. Por ejemplo, *Schizochytrium limacinum* se caracteriza por contener hasta un 58% de grasa cruda y una alta concentración de DHA, representando hasta un 30% del total de los ácidos grasos, característica deseable que ayuda a producir un filete con alto contenido de n-3 HUFA (Perez-Velazquez *et al.*, 2019). El proceso de cultivo de esta microalga ofrece algunas ventajas, tales como su rápido crecimiento lo que favorece la producción de altas cantidades de biomasa. En comparación con otras microalgas, su cultivo puede ser más redituable ya que su producción no requiere luz ni oxígeno, lo que ayuda a reducir

considerablemente el costo de los procesos, por ello *S. limacinum* se destaca como una fuente sustentable de lípidos para la acuicultura en el futuro cercano (Ganuza *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2018). Se han reportado resultados favorables en crecimiento y calidad nutricional del filete al reemplazar total o parcialmente el AP por *Schizochytrium* sp. en dietas para otros peces marinos como *Sparus aurata* (Ganuza *et al.*, 2008), *Epinephelus lanceolatus* (García-Ortega *et al.*, 2016), *Pagrus major* (Seong *et al.*, 2019) y *Morone chrysops* × *M. saxatilis* (Perez-Velazquez *et al.*, 2019).

Recientemente, el interés en los insectos como posible fuente de insumos para la elaboración de alimentos acuícolas ha incrementado debido a sus atractivas características nutricionales, un rápido crecimiento y la capacidad de bio-reciclaje de nutrientes orgánicos, con una producción caracterizada por un bajo impacto ambiental (Benzertiha *et al.*, 2020). Entre los diversos insectos la larva de la mosca soldado negro *Hermetia illucens* se destaca por su contenido lipídico, con un promedio de 24.5% en peso seco, aunque puede alcanzar hasta un 45%; su perfil de AG es rico en ácido láurico (12:0) con una proporción entre 21-49% del total de AG (Tran *et al.*, 2015; Benzertiha *et al.*, 2020). La incorporación de AG de cadena media como el 12:0 puede promover la retención selectiva de HUFA para ser utilizados en otros procesos biológicos, debido a que estos AG son preferencialmente usados como fuente de energía para la  $\beta$ -oxidación gracias a su rápida digestibilidad, absorción y catabolismo (Schönfeld and Wojtczak, 2016; Li *et al.*, 2016; Belghit *et al.*, 2018). La utilización de aceite de larva de *H. illucens* en acuicultura es muy limitada, sin embargo, no se han mostrado efectos negativos en crecimiento al ser utilizado como fuente total o parcial de lípidos en alimentos para peces como *Oncorhynchus mykiss* (Dumas *et al.*, 2018), *Oreochromis niloticus* (Bakar *et al.*, 2021) y barramundi *Lates calcarifer* (Hender *et al.*, 2021). Sin embargo, al igual que los aceites vegetales, incluso cuando no se ve afectado el crecimiento, la calidad nutritiva del filete y los beneficios en la salud para el consumidor humano se ven comprometidos debido a la disminución de DHA y EPA (Li *et al.*, 2016).

Para alcanzar el éxito en el cultivo de totoaba es crucial desarrollar un alimento balanceado formulado con un bajo nivel de inclusión aceite de pescado, pero que satisfaga los requerimientos de DHA y EPA para la especie en la formulación (0.8-1.0%), ello asegura un buen crecimiento, supervivencia y eficiencia de alimentación cuando se utilizan fuentes

alternativas de lípido para reemplazar el AP en la dieta (Lazo *et al.*, 2020). Por otra parte, un aspecto muy importante que requiere ser estudiado, es la influencia de estas fuentes alternativas de lípido en la fisiología de los peces. Por ejemplo, se conoce que el lípido dietario puede regular de manera significativa la actividad y la expresión génica de lipasas relacionadas con el metabolismo de lípidos (Morais *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2017). En peces la digestión de lípidos es realizada principalmente por dos importantes enzimas, la lipasa pancreática dependiente de colipasa, que se encarga de hidrolizar acilglicéridos en la presencia de colipasa (Lowe, 1997; Van Tilbeurgh *et al.*, 1999), y la lipasa dependiente de sales biliares, la cual es caracterizada por tener un rango más amplio de especificidad de sustratos, como triglicéridos, fosfolípidos, ésteres de colesterol y ceras (Terzyan *et al.*, 2000; Kurtovic *et al.*, 2009). El análisis de la expresión génica de estas lipasas contribuirá significativamente a comprender de una mejor manera los procesos transcripcionales y como estos se ven influenciados en respuesta a diferentes fuentes de lípidos utilizadas en la formulación de alimento balanceado.

## II. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación plantea realizar estudios en el uso de fuentes alternativas al aceite de pescado como fuente de lípido en alimento balanceado formulado para juveniles de *Totoaba macdonaldi*, esto contribuirá a aliviar los efectos ambientales negativos de la sobreexplotación pesquera, lo que favorecerá la sustentabilidad de la actividad acuícola. Estas fuentes alternativas no debieran afectar negativamente el crecimiento y metabolismo de los organismos en cultivo y su producción debe ser predecible y controlada tecnológicamente para satisfacer las necesidades de manufactura de alimento balanceado para acuicultura. Sin embargo, la actividad de las lipasas varía de acuerdo a la fuente, la calidad y la cantidad del lípido dietario utilizado en la formulación, y es importante evaluar el efecto que estas variables pueden generar en su expresión génica con el fin de optimizar el desempeño biológico de los organismos cultivados.



### **III. HIPOTESIS**

El cultivo de peces marinos como la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es de interés comercial en México, y sus requerimientos nutricionales de lípido, pueden satisfacerse con alimento balanceado formulado con aceites vegetales, animales y microalgales en reemplazo parcial o total de aceite de pescado, lo cual influenciará la expresión génica de lipasas pancreáticas y el metabolismo de lípidos en peces marinos.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar fuentes de lípido de origen vegetal, animal y microalgal para el reemplazo de aceite de pescado y su efecto sobre lipasas pancreáticas en juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

### **4.2. Objetivos particulares**

- Identificar las lipasas pancreáticas presentes en el tracto digestivo de *T. macdonaldi* y determinar su peso molecular.
- Evaluar el reemplazo de aceite de pescado por aceite de soya y harinas de microalga en dietas para juveniles de *T. macdonaldi* y su efecto sobre el crecimiento, perfil de ácidos grasos y contenido de lipasas pancreáticas en el tracto digestivo.
- Evaluar el reemplazo de aceite de pescado por aceites de camelina y de larva de mosca soldado negro en dietas para juveniles de *T. macdonaldi* y su efecto sobre el crecimiento, perfil de ácidos grasos y expresión génica de lipasas pancreáticas.

## V. ARTÍCULOS PUBLICADOS Y ENVIADOS

Los artículos derivados del trabajo realizado para cada uno de los objetivos particulares establecidos 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
<b>5.1.</b> 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
<b>5.2.</b> Replacement of fish oil by soybean oil and microalgal meals in diets for <i>Totoaba macdonaldi</i> (Gilbert, 1890) juveniles.	Aquaculture	Publicado
<b>5.3.</b> Replacement of fish oil by camelina and black soldier fly larvae oils in diets for juvenile totoaba, <i>Totoaba macdonaldi</i> , and their effect on growth, fatty acid profile and gene expression of pancreatic lipases.	Aquaculture	Sometido

5.1. 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  [mayra.gonzalez@unison.mx](mailto:mayra.gonzalez@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

5.2. Maldonado-Othón, C. A., M. Perez-Velazquez, D. M. Gatlin III y M. L. González-Félix. 2020. Replacement of fish oil by soybean oil and microalgal meals in diets for *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1980) juveniles. *Aquaculture* 529: 735705. Por respeto al derecho de autor, no se reproduce la totalidad del artículo.

Aquaculture 529 (2020) 735705



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquaculture](http://www.elsevier.com/locate/aquaculture)



## Replacement of fish oil by soybean oil and microalgal meals in diets for *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles



Carlos A. Maldonado-Othón<sup>a</sup>, Martin Perez-Velazquez<sup>a</sup>, Delbert M. Gatlin III<sup>b</sup>,  
Mayra L. González-Félix<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

<sup>b</sup> Department of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2258, USA

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Totoaba macdonaldi*  
Fish oil replacement  
*Schizochytrium* sp.  
Soybean oil  
Fatty acid profile

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of soybean oil (SO) and two microalgal meals derived from *Schizochytrium limacinum* (SL1 and SL2) to replace fish oil (FO) in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. Nine isoproteic (54% crude protein, CP) and isolipidic (14% crude fat, CF) diets were formulated based on a 3 × 3 factorial design, using the three lipid sources and three replacement levels, 33%, 66% and 100%. A control diet containing FO as the main lipid source served as a reference. Diets were fed for 6 weeks and were randomly assigned to six replicate tanks of a recirculating aquaculture system, with 25 fish stocked per tank. Initial mean fish weight was 8.08 g; at the end of the trial, statistical differences for growth responses such as weight gain (WG;  $P = 0.0069$ ) and thermal growth coefficient (TGC;  $P = 0.0027$ ) were detected. WG (SL1 = 50.75 g, SL2 = 51.43 g) and TGC (0.148) of fish fed the *S. limacinum* meals were significantly higher than in those fed SO (WG = 41.13 g; TGC = 0.129). Conversely, the hepatosomatic index (HSI;  $P = 0.0009$ ) of fish fed SO was significantly higher (1.38%) compared to those fed the microalgae meals (SL1 = 1.13%, SL2 = 1.22%). Also, proximate composition of liver was significantly influenced by the lipid source and CF was significantly higher ( $P = 0.0067$ ) in fish fed SO (47.68%) than in fish fed SL1 (37.44%) or SL2 (39.86%). The fatty acid (FA) profile of muscle and liver reflected the dietary FA composition; SO prompted increased concentrations of 18:2n-6 and total n-6 FA in fish fillet; whereas, the *S. limacinum* meals increased 22:6n-3, total n-3 FA and the n-3/n-6 ratios, which is highly desirable in food destined for human consumption. In addition, the concentration of pancreatic lipase 1 (70.2 kDa) in anterior intestine and pyloric caeca of fish significantly decreased ( $P = 0.0019$ ) from 2.93 to 1.85 mg g<sup>-1</sup> as the level of FO replaced increased. These findings indicate that up to 100% of FO can be replaced by *S. limacinum* meals improving the growth of *T. macdonaldi* and preserving the nutritional value and the health benefits of the fillet for human consumption; whereas, SO decreased growth and the concentration of 22:6n-3, 20:5n-3, total n-3, and n-3/n-6 ratios, while increasing the HSI and the risk of hepatic dysfunction and steatosis.

### 1. Introduction

Lipids are one of the most important nutrients incorporated into aquafeeds for marine fish because they play a fundamental role in satisfying their energy requirements and provide essential fatty acids, which are vital for maintaining health, growth, and reproduction (Tocher, 2003; Turchini et al., 2009). Fish oil (FO) is widely recognized as the main lipid source used in the manufacture of aquafeeds; it is a highly digestible energy source and contributes a valuable proportion of essential fatty acids, especially n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFA), such as docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) and

eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3). These fatty acids are highly recommended for human consumption and appreciated for their health benefits in the development of the neural system, the prevention of inflammatory conditions, and cardiovascular and neurological diseases (Turchini et al., 2009; Swanson et al., 2012; Calder, 2014). However, the reliance on FO to produce aquafeeds is a limiting factor because of economic, environmental, and sustainability concerns (Tocher et al., 2019).

Vegetable oils (VO) are viable alternative sources of lipid to try to reduce as much as possible the inclusion of FO in aquafeeds. Contrary to FO, the production of VO like soybean, canola, palm, olive, and

\* Corresponding author at: University of Sonora, Department of Scientific and Technological Research, Edificio 7-G, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, e/Sahuariapa y Reforma, Col. Centro, C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico.

E-mail address: [mayra.gonzalez@unison.mx](mailto:mayra.gonzalez@unison.mx) (M.L. González-Félix).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735705>

Received 14 April 2020; Received in revised form 17 June 2020; Accepted 8 July 2020

Available online 14 July 2020

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

5.3. Maldonado-Othón, C.A., De La Re-Vega, E., Perez-Velazquez, M., González-Félix, M.L. Replacement of fish oil by camelina and black soldier fly larvae oils in diets for juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi*, and their effect on growth, fatty acid profile and gene expression of pancreatic lipases. Sometime to the journal *Aquaculture* for publication. In respect to the author's right, the full article is not reproduced.

## Aquaculture

### Replacement of fish oil by camelina and black soldier fly larvae oils in diets for juvenile *Totoaba macdonaldi* and their effect on growth, fatty acid profile, and gene expression of pancreatic lipases --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Section/Category:</b>	Vertebrate Nutrition
<b>Keywords:</b>	Totoaba macdonaldi; fish oil replacement; camelina oil; black soldier fly larvae oil; pancreatic lipases gene expression
<b>Corresponding Author:</b>	Mayra Lizett González-Félix, Ph.D. University of Sonora: Universidad de Sonora Hermosillo, Sonora MEXICO
<b>First Author:</b>	Carlos A. Maldonado-Othón, M.Sc.
<b>Order of Authors:</b>	Carlos A. Maldonado-Othón, M.Sc. Enrique De La Re-Vega, Ph.D. Martin Perez-Velazquez, Ph.D. Mayra L. González-Félix, Ph.D.
<b>Abstract:</b>	<p>The present study evaluated the use of camelina (CO) and black soldier fly larvae (BSFLO) oils as replacements of fish oil (FO) in diets for juvenile <i>Totoaba macdonaldi</i>, and their effect on growth, proximate composition, fatty acid (FA) profile of tissues, and gene expression of bile salt-dependent (BSDL) and colipase-dependent (CDPL) pancreatic lipases. Four isoproteic (51% crude protein) and isolipidic (14% crude fat) diets were formulated based on a 2x2 factorial design with two lipid sources, CO and BSFLO, each tested at two levels of replacement of FO, 30 and 60%. A control diet containing 100% FO was included as a reference. Fish with an overall initial weight (mean <math>\pm</math> standard deviation, S.D.) of <math>3.0 \pm 0.1</math> g were stocked at a density of 100 fish <math>m^{-3}</math>. Each diet was randomly assigned to five replicate tanks, and four tanks for the control. After 7 weeks, weight gain (WG, <math>P = 0.0302</math>) and thermal growth coefficient (TGC, <math>P = 0.0408</math>) were significantly reduced in fish fed the 60% FO replacement level in comparison to the 30% level; fish fed diets containing 30% BSFLO were the only ones achieving statistically similar WG (59.40 g) and TGC (0.175) as fish fed the control diet (WG of 60.68 g and TGC of 0.177). Muscle and liver tissues of fish reflected the FA profiles of experimental diets; fish fed BSFLO showed greater content of lauric acid (12:0) in muscle (<math>0.14\text{--}0.17</math> mg <math>g^{-1}</math>), while alpha-linolenic acid (18:3n-3) was higher in those fed CO (<math>0.25\text{--}0.51</math> mg <math>g^{-1}</math>). Docosahexaenoic acid (22:6n-3) content was statistically similar in fillets from all different treatments, demonstrating selective retention of this biologically important FA, but eicosapentaenoic acid (20:5n-3) decreased as the level of FO replacement by CO or BSFLO in diets increased. The presence of BSDL and CDPL in the digestive tract of <i>T. macdonaldi</i> was confirmed for the first time, but regulation of their gene expression was not significantly affected at a transcriptional level by the progressive replacement of FO by CO or BSFLO under these experimental conditions. These findings suggest that 30% of FO can be successfully replaced by BSFLO in diets for juvenile <i>T. macdonaldi</i>, and a 100 g fillet from fish fed this diet would provide 284 mg of DHA + EPA, satisfying the daily intake recommended for adult consumers.</p>

## VI. DISCUSIÓN

La digestión de los lípidos dietarios en peces es realizada en gran medida por lipasas de origen pancreático principalmente en el intestino anterior y ciegos pilóricos del tracto digestivo; entre ellas, la lipasa dependiente de colipasa (CDPL) hidroliza acilglicéridos, mientras que la lipasa dependiente de sales biliares (BSDL) hidroliza un mayor diversidad de sustratos lipídicos como acilglicéridos, fosfolípidos, ésteres de colesterol, ésteres de ceras, entre otros (Olsen and Ringø, 1997; Kurtovic *et al.*, 2009). En el presente estudio se detectó la presencia de dos lipasas de origen pancreático con pesos moleculares de 70.2 kDa y 47.5 kDa. Previamente una lipasa pancreática de 70.4 kDa del tracto digestivo de *T. macdonaldi* fue parcialmente caracterizada (González-Félix *et al.*, 2018a). Lo más probable es que la lipasa de 70.2 kDa identificada en esta investigación sea la misma previamente reportada de 70.4 kDa. La mínima diferencia entre los pesos moleculares de ambas puede explicarse debido a la dispersión en la variación de las mediciones. De acuerdo a los resultados obtenidos en este análisis, se sugiere que esta lipasa de 70.2-70.4 kDa no se trata de BSDL, ya que su actividad fue detectada sin la suplementación de sales biliares y no incrementó en presencia de sales biliares o extractos biliares naturales (Rueda-López *et al.*, 2017; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Adicionalmente, la segunda lipasa detectada en el presente estudio no había sido previamente reportada para *T. macdonaldi*. Probablemente, esta lipasa no se pudo detectar en la investigación previa debido a las diferentes técnicas zimográficas utilizadas, en el presente estudio se utilizó la técnica de Victoria blue (Yadav *et al.*, 1998), mientras que en el reporte previo se utilizó la técnica de fenol rojo (Singh *et al.*, 2006). La actividad hidrolítica de la lipasa disminuyó en los zimogramas después de adicionar sales biliares a los sustratos cromogénicos de Victoria blue y fenol rojo, lo que ayudó a reforzar la idea que la enzima en el tracto digestivo corresponde a CDPL. Similar a lo observado en rata, la actividad de la CDPL es casi completamente inhibida por sales biliares por encima de la concentración micelar crítica. Sin embargo, con concentraciones por debajo de ella, las sales biliares conjugadas estimularon la tasa inicial de hidrólisis de butirina. La colipasa supera la inhibición de la lipasa por un cambio de pH de 6 a 7, con respecto al pH óptimo de la lipasa sola que es de 8-9. Por el contrario, en ausencia de sales biliares, la colipasa estimula la actividad de la lipasa en el rango completo de

su actividad (Borgström y Erlanson, 1973). Por lo tanto, la adición de sales biliares a ambos sustratos cromogénicos pudo haber inhibido a la CDPL como se observó previamente en rata, sin embargo, dado que el pH se ajustó a 7.4 en el zimograma de rojo de fenol, mientras que en el de Victoria blue se ajustó a 8, ello probablemente pudo haber inducido la actividad lipolítica en los geles de SDS-PAGE, y que se evidenciara efectivamente para la lipasa de 47.5 kDa solamente utilizando el método de Victoria blue. Dos lipasas con pesos moleculares de 79.6 y 54.9 kDa fueron detectadas en el tracto digestivo de *Oncorhynchus tshawytscha* (Kurtovic *et al.*, 2010), sugiriendo que posiblemente pudieran ser la forma inactiva y la forma final de la BSDL de esta especie. Lo mismo pudiera estar pasando para las dos bandas detectadas en este estudio para *T. macdonaldi*, pero con la lipasa dependiente de colipasa.

Las lipasas en peces parecen tener un rango amplio de pesos moleculares, con valores reportados entre 40 y 70 kDa aproximadamente (Kurtovic *et al.*, 2009). Las lipasas de totoaba con 70.2 y 47.5 kDa cuentan con un peso molecular similar a los reportados para otras especies, por ejemplo, 57 kDa en *Oncorhynchus mykiss* (Léger *et al.*, 1979), 60 kDa en *Gadus morhua* (Gjellesvik *et al.*, 1992), 64 en kDa *Pagrus major* (Iijima *et al.*, 1998), 46 kDa en *Oreochromis niloticus* (Taniguchi *et al.*, 2001), 74 kDa en *Cyprinus carpio* (Görgün y Akpınar, 2012), y 80.3 kDa en *Sciaenops ocellatus* (González-Félix *et al.*, 2018b).

La búsqueda de fuentes alternativas de lípido para reemplazar el AP se ha convertido en una tendencia mundial, y los ingredientes para reemplazarlo preferiblemente deben ser económicamente viables y producidos de manera sustentable. En el primer estudio de evaluación de reemplazo de aceite de pescado fue evidente que las dietas que contenían las dos diferentes harinas comerciales de *Schizochytrium limacinum* (SL1 y SL2) promovieron un mejor crecimiento en *T. macdonaldi* que aquellas dietas que contenían AS, o funcionaron incluso igual o mejor que en aquellos peces alimentados con la dieta control con 100% AP. Harinas de *S. limacinum* han sido exitosamente utilizadas para reemplazar total o parcialmente el AP en alimentos balanceados para otras especies en cultivo, sin mostrar efectos negativos en crecimiento, índices somáticos y eficiencia de alimentación, por ejemplo, *Salmo salar* (Sprague *et al.*, 2015), *Sparus aurata* (Ganuza *et al.*, 2008), *E. lanceolatus* (García-Ortega *et al.*, 2016), *O. niloticus* (Sarker *et al.*, 2016a,b), *S. ocellatus* (Perez-Velazquez *et al.*, 2018), *P. major* (Seong *et al.*, 2019) and *M. chrysops* × *M. saxatilis* (Perez-Velazquez *et al.*, 2019). El crecimiento



favorable observado en los peces alimentados con harinas de *S. limacinum* puede ser explicado, entre otros factores, por la mejora en el factor de conversión alimenticia (FCA), influenciado principalmente por su alta digestibilidad, especialmente para los fosfolípidos omega-3, que ayudan a promover una mayor eficiencia en la digestión, absorción y transporte de lípidos (Sarker *et al.*, 2016a,b). A pesar de que los valores de FCA en este estudio no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos, los peces que fueron alimentados con AS mostraron un valor más alto (1.07), comparados con los que consumieron las harinas SL1 (0.93) y SL2 (0.97).

A pesar de que el reemplazo de AP por AS resultó en un crecimiento, supervivencia y FCA similar a los peces alimentados con la dieta control 100% AP, su inclusión afectó negativamente el índice hepatosomático (IH) y factor de condición (K). El incremento del IH debido a la acumulación de grasa en hígado se ha reportado previamente cuando el AS ha reemplazado totalmente el AP en dietas para *Diplodus puntazzo* (Piedecausa *et al.*, 2007), *C. parvipinnis* (González-Félix *et al.*, 2016), *O. niloticus* (Peng *et al.*, 2016) y *L. crocea* (Du *et al.*, 2017; Mu *et al.*, 2018). Por el contrario, los peces que fueron alimentados con *S. limacinum* promovieron la disminución del IH, similar a lo observado para *P. major* alimentado con dietas con 100% de reemplazo de AP por harina de *Schizochytrium* sp., mostrando una reducción de 1.47 a 1.17 (Seong *et al.*, 2019). Aparentemente la estructura química de los lípidos juega un papel fundamental en reducir la esteatosis del hígado, aquellos lípidos que contienen DHA y EPA en forma de fosfolípidos benefician más la salud de hígado que aquellos en forma de triglicéridos, promoviendo la reducción de la acumulación de grasa en este tejido debido a la disminución de la síntesis de ácidos grasos y el incremento de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos no esenciales (Cohn *et al.*, 2008; Tandy *et al.*, 2009).

El perfil de ácidos grasos del tejido muscular y hepático reflejó la composición de AG de las dietas experimentales, similar a lo reportado para otras especies de peces (Martínez-Llorens *et al.*, 2007; Sprague *et al.*, 2015; González-Félix *et al.*, 2016). Esto fue especialmente evidente para algunos AG, por ejemplo, la concentración de 18:2n-6, 18:3n-3 y total n-6 incrementó considerablemente a medida que el nivel de reemplazo de AP por AS aumentó, por el contrario, las concentraciones de 22:6n-3, 20:5n-3, n-3 total y proporción n-3/n-6 disminuyeron. Tendencias similares se han observado cuando el AS ha sido utilizado en dietas

para otras especies de sciánidos como *A. regius* (Emre *et al.*, 2016), *C. parvipinnis* (González-Félix *et al.*, 2016) y *L. crocea* (Mu *et al.*, 2018). Por otra parte, la utilización de *S. limacinum* incrementó las concentraciones de DHA, n-3 total y proporción n-3/n-6, características altamente deseables en alimentos destinados al consumo humano. Previamente se han reportado observaciones similares cuando harinas de *S. limacinum* se utilizaron para reemplazar total o parcialmente el AP en dietas para *E. lanceolatus* (García-Ortega *et al.*, 2016), *Seriola rivoliana* (Kissinger *et al.*, 2016), *S. ocellatus* (Perez-Velazquez *et al.*, 2018) y *P. major* (Seong *et al.*, 2019). Las concentraciones de DHA en el músculo de los peces alimentados con las harinas de microalga fueron 17% y 35% mayores que en aquellos alimentados con AP. Las altas concentraciones de este AG en el músculo de totoaba se explican por el hecho de que el DHA no es un buen sustrato para la  $\beta$ -oxidación, pero sí sumamente importante para otros procesos biológicos, por lo que se almacena selectivamente en tejidos específicos (NRC, 2011).

Los ácidos grasos esenciales, particularmente DHA y EPA son nutraceuticos, promueven beneficios en la salud de seres humanos, como la reducción del riesgo de enfermedades neurológicas y cardiovasculares (Swanson *et al.*, 2012; Calder *et al.*, 2014). La ingesta diaria recomendada de DHA + EPA en adultos es de 250 mg para la prevención de enfermedades coronarias (FAO, 2021). Esta ingesta diaria puede satisfacerse con el consumo de un filete de totoaba alimentada con las harinas SL1 y SL2, lo que representaría una ingesta total de 380 y 428 mg de DHA + EPA, respectivamente, igualando o mejorando el contenido de estos AG esenciales en el filete de pescado alimentado con la dieta control (394 mg de DHA + EPA).

El reemplazo total de AP por AS y harinas de *S. limacinum* no afectó considerablemente la composición proximal del músculo de *T. macdonaldi*, probablemente debido a la naturaleza isoproteica e isolipídica de las dietas experimentales. Sin embargo, los peces alimentados con AS mostraron un incremento considerable en el contenido de grasa en hígado, similar a lo observado en *Polydactylus sexfilis* (Deng *et al.*, 2014), *C. parvipinnis* (González-Félix *et al.*, 2016) y *L. crocea* (Du *et al.*, 2017), entre otros. Existe evidencia que la alta concentración de ácido linoleico en el AS promueve un incremento en la síntesis de AG y la acumulación de grasa en hígado que puede provocar entre otros efectos negativos, la deformación e inflamación de los hepatocitos y peroxidación lipídica (Caballero *et al.*, 2004; Piedecausa *et al.*, 2007; Peng *et*

al., 2014). A pesar del alto contenido de grasa en el hígado de *T. macdonaldi* alimentados con AS, no se observaron efectos perjudiciales en el crecimiento o supervivencia durante el periodo de 42 de experimentación, similar a lo reportado para *C. parvipinnis* (González-Félix *et al.*, 2016) y *Diplodus puntazo* (Piedecausa *et al.*, 2007); sin embargo, el efecto del uso de AS en el desempeño biológico durante un periodo del cultivo más largo tiene que ser evaluado.

El valor nutricional de una dieta para una especie de pez está relacionado estrechamente con la capacidad de adecuadamente digerir y absorber los nutrientes dietarios, basándose en la disponibilidad, tipo y características funcionales de sus enzimas digestivas (Solovyev y Gisbert, 2016; Hani *et al.*, 2018). Varios factores influyen la secreción, concentración y actividad de las lipasas pancreáticas, como la especie, tamaño, etapa de desarrollo, temperatura, estado prandial, y el tipo y cantidad de lípido dietario (Morais *et al.*, 2007; Hani *et al.*, 2018). En el presente estudio, los juveniles de *T. macdonaldi* con peso promedio individual de 55.38 g, mostraron concentraciones que variaron desde 1.85 a 2.93 mg g<sup>-1</sup> tejido para la lipasa 1 (70.2 kDa) y de 0.87 a 1.03 mg g<sup>-1</sup> tejido para la lipasa 2 (47.5 kDa). Se observó un efecto significativo sobre la concentración de lipasa pancreática 1, reduciendo su concentración aproximadamente un 37% conforme el nivel de reemplazo de AP aumentó de 33 al 100%, probablemente como respuesta a las diferentes fuentes de lípido utilizadas y sus respectivos perfiles de AG. La especificidad de las lipasas y la digestibilidad de los AG incrementa dependiendo del grado de insaturación, por lo que una mayor digestibilidad es observada en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) > poliinsaturados (PUFA) > monosaturados > saturados (Olsen *et al.*, 1998; Røsjø *et al.*, 2000; Sarker *et al.*, 2016b). El contenido dietario de PUFA + HUFA incrementó un 13.5% al aumentar el nivel de reemplazo de AP de 33 al 100%, lo que se tradujo en un aumento en la digestibilidad de esta fracción lipídica, especialmente en las dietas que contenían harinas de *S. limacinum* con un mayor contenido de HUFA; en peces, una respuesta adaptativa a largo plazo a un perfil de ácidos grasos más digeribles puede provocar una secreción más baja de lipasa pancreática, similar a lo observado en el presente estudio (Morais *et al.*, 2007).

En el tercer estudio donde se evaluó la utilización de aceite de larva de mosca soldado negro *H. illucens* (BSFLO) y camelina *C. sativa* (AC), los resultados evidenciaron que los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con dietas que contenían 30% BSFLO tuvieron un crecimiento estadísticamente similar en términos de peso ganado y coeficiente térmico de

crecimiento que aquellos peces alimentados con la dieta control con 100% AP, mientras que el resto de los tratamientos, 60% BSFLO, 30% AC y 60% AC significativamente redujeron el crecimiento de los peces. Debido a que las dietas fueron formuladas para ser isoproteicas e isolipídicas, su efecto en el crecimiento está probablemente relacionado a la composición de AG de las fuentes de lípidos, sugiriendo que las diferencias de n-3 HUFA en las formulaciones promovieron un crecimiento menos eficiente, similar a lo observado para otras especies cuando el AP fue sustituido por AC (Hixon *et al.*, 2017; Huyben *et al.*, 2020; Ofori-Mensah *et al.*, 2020) o harina sin desgrasar de *H. illucens* (Zarantonello *et al.*, 2018). Se observó un decremento del contenido total de DHA + EPA en las dietas experimentales, disminuyendo de 3.0% en la dieta control 100% AP, a 2.6% en las dietas con 30% de BSFLO y AC, hasta 2.1 y 2.0% en las dietas con 60% AC y BSFLO, respectivamente. No obstante, incluso con la disminución de estos AG esenciales, el requerimiento mínimo para la totoaba de 0.8 a 1.0% se cubrió satisfactoriamente (Lazo *et al.*, 2020), por lo que las diferencias en crecimiento no están relacionadas con deficiencias en la concentración dietaria de EPA o DHA, sin embargo, se ha demostrado que niveles de éstos AG esenciales por encima del mínimo ayudan a mejorar el crecimiento y la supervivencia de los peces (Tocher 2010).

La proporción de DHA/EPA dietario es un factor crítico durante etapas tempranas de desarrollo de los peces; en el presente estudio las dietas que produjeron un mejor crecimiento en los peces, 100% AP y 30% BSFLO, resultaron tener las proporciones DHA/EPA más bajas entre los tratamientos, sin embargo, la dieta con 30% AC, tenía un valor similar de DHA/EPA que la dieta con 30% BSFLO, pero produjo un crecimiento menor en los peces alimentados con este tratamiento, lo que indica que hay otra variable importante que pudiera estar generando un efecto significativo en el crecimiento. Una de las posibles razones es que el contenido abundante de ácido láurico (12:0) en el aceite de *H. illucens* pudo haber sido utilizado preferentemente como fuente de energía, promoviendo un efecto de ahorro de n-3 HUFA, lo que permitió la utilización del EPA y DHA para el crecimiento (Turchini *et al.*, 2010; Mata-Sotres *et al.*, 2018; Belghit *et al.*, 2018), mientras que la dieta control 100% AP contenía mayores concentraciones de ambos AG lo que generó un crecimiento estadísticamente mayor. Los mecanismos que explican la ventaja del ácido láurico como fuente de energía consisten en su rápida absorción y transporte dentro del intestino; influenciado por la longitud de la cadena, este AG de cadena

media se difunde pasivamente a través de la mucosa gástrica hacia la vena porta, unido a la albúmina, para ser transportado al hígado. Una vez en hígado, los AG de cadena corta y media se difunden pasivamente a través de la membrana mitocondrial, por el contrario, los AG de cadena larga necesitan transporte asistido por carnitina, por lo que la tasa catabólica de 12:0 es más eficiente para producción de energía (Dayrit, 2015; Shah y Limketkai, 2017). Recientemente, algunos estudios han evaluado el uso de BSFLO en dietas para otros peces carnívoros, sin mostrar efectos negativos en el crecimiento, por ejemplo, en alimento para *L. calcarifer* se reemplazó eficientemente el 30% de AP con BSFLO (Hender *et al.*, 2021), que es comparable con los resultados del presente estudio. También en una dieta para *S. salar* 66% del aceite de canola fue sustituido por BSFLO, mientras que el 33% restante correspondió a AP (Belghit *et al.*, 2018), para *O. mykiss* el 100% de reemplazo de AP en dietas fue logrado (Dumas *et al.*, 2018).

La composición de AG del músculo e hígado de los peces reflejó el perfil de AG de las dietas experimentales, como se ha observado previamente para la *T. macdonaldi* (Mata-Sotres *et al.*, 2018; Lazo *et al.*, 2020; Maldonado-Othón *et al.*, 2020). La concentración de 12:0 en músculo aumentó conforme el nivel de reemplazo de AP por BSFLO en dietas incrementó, tendencias similares se han observado para otras especies como *C. carpio* (Li *et al.*, 2016), *S. salar* (Belghit *et al.*, 2018), *O. mykiss* (Renna *et al.*, 2017) y *Danio rerio* (Zarantoniello *et al.*, 2018). Por otra parte, las concentraciones de 18:3n-3, 18:2n-6 y n-6 total en músculo e hígado incrementaron significativamente al aumentar la inclusión de AC en dietas, que fueron significativamente mayores que la dieta control 100% AP. De manera similar, el contenido de 18:3n-3 incrementó cuando AC fue usado para reemplazar total o parcialmente el AP en dietas para *G. morhua* (Morais *et al.*, 2012; Hixon *et al.* 2014), *S. aurata* (Ofori-Mensah *et al.*, 2020) y *P. major* (Mzengereza *et al.*, 2021).

El contenido de DHA en músculo fue estadísticamente similar entre los filetes de los diferentes tratamientos, demostrando retención selectiva de este importante AG, similar a lo reportado para otras especies (NRC, 2011; Xu *et al.*, 2014). Por el contrario, la concentración de EPA disminuyó progresivamente conforme se aumentó el nivel de reemplazo de AP, aunque esta tendencia se vio atenuada en peces alimentados con aceite de larva de *H. illucens*, especialmente en aquellos alimentados con 30% BSFLO, los cuales mostraron la mayor

concentración de EPA solamente por detrás de aquellos alimentados con la dieta control 100% AP. Como se mencionó anteriormente, la ingesta mínima diaria DHA + EPA en adultos para ayudar a la prevención de enfermedades coronarias es de 250 mg (FAO, 2021). Un filete de 100 g de totoaba alimentada con la dieta control 100% AP proporciona 355 mg DHA + EPA, mientras que aquella alimentada con 30% BSFLO proporciona 284 mg, cantidades suficientes para satisfacer la ingesta mínima recomendada para beneficiar la salud del consumidor humano. Por el contrario, la ingesta mínima diaria no se alcanzó en los filetes provenientes del resto de los tratamientos experimentales, aunado con la disminución del crecimiento observado, por lo que no se recomiendan éstas formulaciones para ser utilizadas como alimento balanceado para *T. macdonaldi*.

La composición proximal del músculo e hígado de los peces no se vio afectada por los diferentes tratamientos. La totoaba es considerada un pez magro debido a su bajo contenido de grasa en músculo alrededor de 2%, el mayor reservorio de grasa para este pez es el hígado. Estudios previos han reportado que el uso de *C. sativa* y *H. illucens* como fuente de lípido no promueve un efecto significativo sobre la composición proximal del músculo de otras especies como *G. morhua* (Morais *et al.*, 2012), *O. niloticus* (Toyes-Vargas *et al.*, 2020), *O. mykiss* (Dumas *et al.*, 2018) y *C. carpio* (Xu *et al.*, 2020). Por otra parte, aunque no fue estadísticamente significativo, la utilización de BSFLO pareció haber disminuido la grasa en hígado de la totoaba, similar a lo previamente reportado para *S. salar*, atribuyendo este efecto al alto contenido de ácido láurico en este tipo de aceite, su alta oxidación hepática y baja tasa de almacenamiento (Belghit *et al.*, 2018).

El conocimiento de los patrones de expresión génica a través del análisis de transcriptomas genera información valiosa sobre las respuestas moleculares generadas a partir de adaptaciones bioquímicas y fisiológicas provocadas por modificaciones nutricionales o dietarias (Morais *et al.*, 2012), que podrían resultar útiles a la hora de evaluar y optimizar la incorporación de nuevos ingredientes en formulaciones de alimentos acuícolas. Por ejemplo, la cantidad y el tipo de lípido dietario promueven diferentes efectos en la regulación de la expresión génica de las lipasas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Morais *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2016). En el último estudio, se confirmó por primera vez la presencia de dos lipasas, BSDL y CDPL. Sin embargo, la expresión génica de estas enzimas no se vio

significativamente afectada por el reemplazo progresivo de AP por AC o BSFLO, pero fue muy evidente que hubo alta variabilidad biológica que no permitió la detección de diferencias significativas, similar a lo observado por Tocher *et al.* (2006). El mayor cambio en la expresión génica se registró para BSDL, probablemente debido a la gama más amplia de sustratos lipídicos en los que actúa (Terzyan *et al.*, 2000; Kurtovic *et al.*, 2009), mientras que para CDPL ocurrió lo contrario, su expresión disminuyó en comparación con los peces alimentados con 100% FO, excepto en los alimentados con 60% BSFLO, que mostraron el mismo valor que los peces del grupo control. Oku *et al.* (2006) reportaron que el ayuno y la realimentación no influyeron significativamente en un cambio en la expresión del génica de la lipasa pancreática en *P. major*, y sugirieron que la regulación traduccional y postraduccional puede ser más importante que la regulación transcripcional en la respuesta nutricional de esta enzima en esa especie. Debido a que en el presente estudio no se detectaron diferencias estadísticas en la expresión génica de las lipasas de *T. macdonaldi*, es muy probable que los procesos traduccionales y postraduccionales también desempeñen un papel fundamental en la regulación de la expresión de BSDL y CDPL, pues en un estudio previo en *T. macdonaldi* se demostró que los cambios en el perfil de AG de la dieta influenciaron significativamente en la concentración de la lipasa pancreática de 70.2 kDa en el intestino anterior y ciego pilóricos, disminuyendo significativamente a medida que aumentaba el nivel de reemplazo de AP por harinas de *S. limacinum* y AS en las dietas (Maldonado-Othón *et al.*, 2020). La expresión del ARNm de las lipasas pancreáticas entre diferentes especies de peces es inconsistente, pero la información relacionada con este tema aún es escasa, por lo que es necesario evaluar diferentes fuentes de lípidos y niveles de reemplazo de AP para comprender mejor estos procesos metabólicos en los peces.

## VII. CONCLUSIONES

- Dos lipasas pancreáticas de 70.2 y 47.5 kDa fueron detectadas en el tracto digestivo de *T. macdonaldi*.
- La lipasa de 70.2 kDa parece ser la misma enzima previamente detectada de 70.4 kDa en ciegos pilóricos e intestino anterior de totoaba.
- La otra lipasa de 47.5 kDa no había sido previamente detectada, y similar a lo sugerido para otras especies, pudiera tratarse de la forma inactiva y de la forma final de una lipasa pancreática dependiente de colipasa, ya que su actividad enzimática fue detectada sin la suplementación de sales biliares, mientras que el adicionar sales biliares inhibió la actividad enzimática.
- Hasta un 100% de AP puede ser reemplazado por las harinas de *S. limacinum* en dietas para *T. macdonaldi*, resultando en un mejor crecimiento en comparación con los peces alimentados con AS, y preservando el valor nutricional y los beneficios del filete en la salud del consumidor humano debido al aumento de la concentración de DHA, n-3 total y proporción n-3/n-6.
- La utilización de AS causó un crecimiento aproximadamente 20% menor al logrado por los peces alimentados con las harinas de microalgas, y también redujo significativamente la concentración de DHA, EPA, n-3 total y la proporción n-3/n-6, al mismo tiempo que aumentó el IH y el riesgo de disfunción hepática y esteatosis en juveniles de totoaba.
- La utilización de harinas de *S. limacinum* promovió un efecto significativo en la concentración de la lipasa pancreática de 70.2 kDa en el tracto digestivo de totoaba, disminuyendo la cantidad de enzima secretada conforme incrementó el nivel de reemplazo de AP, potencialmente promovido por un incremento en la digestibilidad de la fracción lipídica, especialmente en las dietas con harinas de *S. limacinum* con mayor contenido de HUFA.
- Hasta un 30% de AP puede ser exitosamente reemplazado por aceite de larva de *H. illucens* en dietas para juveniles de *T. macdonaldi*, resultando en un crecimiento similar a los peces alimentados con la dieta control 100% AP.



- El reemplazo de AP por 60% BSFLO, 30% AC y 60% AC en las dietas resultó en una disminución significativa del crecimiento.
- Los perfiles de AG del músculo e hígado de los peces reflejaron en gran medida la composición de AG de las dietas, mostrando un incremento significativo de la concentración de 12:0 al aumentar el reemplazo de AP por BSFLO, mientras que la concentración de 18:3n-3, 18:2n-6 y n-6 total aumentó conforme se aumentó el nivel de inclusión de AC en las dietas.
- El contenido de DHA fue estadísticamente similar en los filetes de los peces de todos los diferentes tratamientos en el último estudio, lo evidenció la retención selectiva de este AG esencial, mientras que el contenido de EPA se redujo progresivamente en el músculo a medida que aumentaba el nivel de reemplazo de AP, por lo que es muy probable que este AG esencial sea en gran medida el responsable del diferente desempeño biológico los juveniles de totoaba en dicho experimento.
- Un filete de 100 g proveniente de una totoaba alimentada con la dieta que contenía 30% BSFLO aporta 284 mg de DHA + EPA, lo que permite satisfacer la recomendación mínima diaria para beneficiar la salud del consumidor humano.
- La presencia de dos lipasas pancreáticas, BSDL y CDPL, se confirmó por primera vez en *T. macdonaldi*, pero la regulación de su expresión génica no se vio afectada significativamente a nivel transcripcional por el reemplazo progresivo de AP por BSFLO o AC bajo estas condiciones experimentales.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuras investigaciones, el aislamiento y purificación de ambas lipasas pancreáticas, además, determinar la actividad enzimática óptima para la lipasa de 47.5 kDa de *T. macdonaldi*.
- Evaluar una mayor gama de fuentes de lípido novedosas para el reemplazo de AP en alimentos para totoaba, especialmente otras especies de microalgas e insectos, que son los tipos de lípidos que brindaron mejores resultados en los estudios realizados.
- Evaluar el uso de aceite de *Camelina sativa* transgénica rico en omega-3, para determinar si esta variante puede propiciar resultados más favorables que los obtenidos con el aceite de camelina normal.
- Evaluar niveles de reemplazo de AP por aceite de larva de *H. illucens* ligeramente por encima de 30% y por debajo de 60%, para poder así determinar el nivel óptimo de inclusión de esta fuente de lípido en alimentos para totoaba.
- Para lograr un mejor entendimiento de los procesos metabólicos involucrados en la digestión de los lípidos mediante las lipasas pancreáticas, se recomienda realizar de manera conjunta los análisis de expresión génica y de cuantificación del contenido de lipasas en el tracto digestivo para poder relacionar el efecto de las diferentes fuentes de lípido en procesos transcripcionales, traduccionales y postraduccionales.
- Evaluar la expresión génica de lipasas de origen hepático, ya que este órgano es uno de los principales reguladores del metabolismo de síntesis, transporte y catabolismo de ácidos grasos en peces.
- Realizar análisis histológicos del tejido hepático para mejorar el conocimiento sobre el efecto de estas nuevas fuentes de lípido a nivel celular en este tejido de *T. macdonaldi*.
- Evaluar el reemplazo de harina y aceite de pescado por harina y aceite de larva de *H. illucens* de manera simultánea, con información recabada en varios estudios realizados en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del DICTUS, de la Universidad de Sonora.
- Realizar la secuenciación completa de los genes de la lipasa dependiente de sales biliares y de la lipasa dependiente de colipasa.

## IX. LITERATURA CITADA

- Abramovič, H. y V. Abram. 2005. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Food Technology and Biotechnology* 43: 63–70.
- Bakar, N. H. A., S. A. Razak, N. M. Taufek y Alias, Z. 2021. Evaluation of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae oil as meal supplementation in diets for red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). *The International Journal of Tropical Insect Science* 41: 2093–2102.
- Barrows, F. T., D., A. Bellis, J. T. Krogdahl, E. Silverstein, M. Herman, W. M. Sealey, M. B. Rust y D. M. Gatlin, III. 2008. Report of plant products in Aquafeeds Strategic Planning Workshop: an integrated interdisciplinary roadmap for increasing utilization of plant feedstuffs in diets for carnivorous fish. *Reviews in Fisheries Sciences* 16: 449–455.
- Belghit, I., R. Waagbø, E. J. Lock y N. S. Liland, 2018. Insect-based diets high in lauric acid reduce liver lipids in freshwater Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* 25: 343–357.
- Benzertiha, A., B. Kierończyk, M. Rawski, Z. Mikołajczak, A. Urbański, L. Nogowski y D. Józefiak. 2020. Insect fat in animal nutrition—A review. *Annals of Animal Science* 20: 1217–1240.
- Borgstrom, B. y C. Erlanson. 1973. Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. *European Journal of Biochemistry* 37: 60–68.
- Caballero, M. J., M. S. Izquierdo, E. Kjørsvik, A. J. Fernández y G. Rosenlund. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27: 531–541.
- Calder, P. C. 2014. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116: 1280–1300.
- Castro, C., G. Corraze, A. Firmino-Diógenes, L. Larroquet, S. Panserat y A. y Oliva-Teles. 2016. Regulation of glucose and lipid metabolism by dietary carbohydrate levels and lipid sources in gilthead sea bream juveniles. *British Journal of Nutrition* 116: 19–34.
- Cohn, J. S., E. Wat, A. Kamili y S. Tandy. 2008. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 19: 257–262.
- Deng, D. F., Z. Y. Ju, W. G. Dominy, L. Conquest, S. Smiley y P. J. Bechtel. 2014. Effect of replacing dietary menhaden oil with pollock or soybean oil on muscle fatty acid composition and growth performance of juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*). *Aquaculture* 422-423: 91–97.
- Dayrit, F. M. 2015. The Properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 92: 1–15.
- Du, J., H. Xu, S. Li, Z. Cai, K. Mai y Q. Ai. 2017. Effects of dietary chenodeoxycholic acid on growth performance, body composition and related gene expression in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed diets with high replacement of fish oil with soybean oil. *Aquaculture* 479: 584–590.

- Duan, Q. Y., K. S. Mai, J. K. Shentu, Q. H. Ai, H. Y. Zhong, Y. J. Jiang, L. Zhang, C. X. Zhang y S. T. Guo. 2014. Replacement of dietary fish oil with vegetable oils improves the growth and flesh quality of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Ocean University of China* 13: 1–8.
- Dumas, A., T. Raggi, J. Barkhouse, E. Lewis y E. Weltzien. 2018. The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 492: 24–34.
- Emre, Y., A. Kurtoglu, N. Emre, B. Güroy y D. Güroy. 2016. Effect of replacing dietary fish oil with soybean oil on growth performance, fatty acid composition and haematological parameters of juvenile meagre, *Argyrosomus regius*. *Aquaculture Research* 47: 2256–2265.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2021. GLOBEFISH – Information and analysis on world fish trade. A simple overview of omega-3. Retrieved from <https://www.fao.org/in-action/globefish/fishery-information/resource-detail/en/c/1052098/>
- Ganuza, E., T. Benítez-Santana, E. Atalah, O. Vega-Orellana, R. Ganga y M. S. Izquierdo. 2008. *Cryptothecodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture* 277: 109–116.
- García-Ortega, A., T. J. Trushenski y K. Kissinger. 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.
- Gjellesvik, D. R., D. Lombardo y B. T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1124: 123–134.
- González-Félix, M. L., D. M. Gatlin III, M. Perez-Velazquez, K. Webb, A. García-Ortega y M. Hume. 2018b. Red drum *Sciaenops ocellatus* growth and expression of bile salt-dependent lipase in response to increasing dietary lipid supplementation. *Fish Physiology and Biochemistry*. 44: 1319–1331.
- González-Félix, M. L., C. A. Maldonado-Othón y M. Perez-Velazquez. 2016. Effect of dietary lipid level and replacement of fish oil by soybean oil in compound feeds for the shortfin corvina (*Cynoscion parvipinnis*). *Aquaculture* 454: 217–228.
- González-Félix, M. L., E. B. Santana-Bejarano, M. Perez-Velazquez y A. G. Villalba-Villalba. 2018a. Partial characterization, quantification and activity of pancreatic lipase in the gastrointestinal tract of *Totoaba macdonaldi*. *Archives of Biological Sciences* 70: 489–496.
- Görgün, S. y M. A. Akpınar. 2012. Purification and characterization of lipase from the liver of carp, *Cyprinus carpio* L. (1758), living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12: 207–215.
- Hani, Y. M. I., A. Marchand, C. Turies, E. Kerambrun, O. Palluel, A. Bado-Nilles, R. Beaudouin, J. Porcher, A. Geffard y O. Dedourge-Geffard. 2018. Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. *PLoS ONE* 13: e0194932.

- Hender, A., M. A. B. Siddik, J. Howieson y R. Fotedar. 2021. Black soldier fly, *Hermetia illucens* as an alternative to fishmeal protein and fish oil: impact on growth, immune response, mucosal barrier status, and flesh quality of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Biology* 10: 1–17.
- Hixson, S. y C. Parrish. 2014. Substitution of fish oil with camelina oil and inclusion of camelina meal in diets fed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) and their effect on growth, tissue lipid classes, and fatty acids. *Journal of Animal Sciences* 92: 1055–1067.
- Hixson, S.M., C. C. Parrish, X. Xue, J. S. Wells, S. A. Collins, D. M. Anderson y M. L. Rise. 2017. Growth performance, tissue composition, and gene expression responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of different lipid sources. *Aquaculture* 467: 76–88.
- Huyben, D., S. Rimoldi, C. Ceccotti, D. Montero, M. Betancor, F. Iannini y G. Terova. 2020. Effect of dietary oil from *Camelina sativa* on the growth performance, fillet fatty acid profile and gut microbiome of gilthead Sea bream (*Sparus aurata*). *PeerJ* 8: e10430.
- Iijima, N., S. Tanaka y Y. Ota. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 59–69.
- Juárez, L. M., P. A. Konietzko y M. H. Schwarz. 2016. Totoaba Aquaculture and conservation: Hope for an endangered fish from Mexico's sea of Cortez. *World Aquaculture Society* 47: 30–38.
- Kissinger, K. R., García-Ortega, A., Trushenski, J.T., 2016. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture* 452, 37–44.
- Köse, I. y M. Yildiz. 2013. Effect of diets containing sesame oil on growth and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology* 29: 1318–1324.
- Kurtovic, I., S. N. Marshall y X. Zhao. 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and zeland hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 1041–1060.
- Kurtovic, I., S. N. Marshall, X. Zhao y B. K. Simpson. 2009. Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Sciences* 17: 18–40.
- Lazo, J. P., J. P. Fuentes-Quesada, G. Villareal-Rodarte, M. T. Viana y B. Baron-Sevilla. 2020. The effect of dietary n-3 LC-PUFA levels on growth, survival, and feed utilization in juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 525: 735350.
- Leger, C., V. Ducruet y J. Flanzy. 1979. Lipase et colipase de la truite arc-en-ciel. Quelques resultats recents. *Annals of Animal Science Biochemistry and biophysics* 1: 825–832.
- Li, S., H. Ji, B. Zhang, J. Tian, J. Zhou y H. Yu. 2016. Influence of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae oil on growth performance, body composition, tissue fatty acid composition

- and lipid deposition in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 465: 43-52.
- Lowe, M. E. 1997. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annual Review in Nutrition*. 17: 141–158.
- Maldonado-Othón, C. A., M. Perez-Velazquez, D. M. Gatlin III y M. L. González-Félix. 2020. Replacement of fish oil by soybean oil and microalgal meals in diets for *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1980) juveniles. *Aquaculture* 529: 735705.
- Martínez-Llorens, S., A. Tomás, A. V. Moñino, M. Pla y M. Jover. 2007. Effects of dietary soybean oil concentration on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research* 38: 76–81.
- Mata-Sotres, J. A., A. Tinajero-Chavez, F. Barreto-Curiel, G. Pares-Sierra, O. B. Del Rio-Zaragoza, M. T. Viana y A. N. Rombenso. 2018. DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in *Totoaba macdonaldi* fish oil-free feeds containing poultry by-product meal and beef tallow. *Aquaculture* 497: 440–451.
- Morais, S., C. Cahu, J. L. Zambonino-Infante, J. Robin, I. Rønnestad, M. T. Dinis y L. E. C. Conceição. 2004. Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids* 39: 449–458.
- Morais, S., L. E. C. Conceição, I. Rønnestad, W. Koven, C. Cahu, J. L. Zambonino Infante y M. T. Dinis. 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture* 268: 106–122.
- Morais, S., R. B. Edvardsen, D. R. Tocher y J. G. Bell. 2012. Transcriptomic analyses of intestinal gene expression of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed diets with Camelina oil as replacement for fish oil. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 161: 283–293.
- Mu, H., H. H. Shen, J. H. Liu, F. L. Xie, W. B. Zhang y K. S. Mai. 2018. High level of dietary soybean oil depresses the growth and antioxidative capacity and induces inflammatory response in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish and Shellfish Immunology* 77: 465–473.
- Mzengereza, K., M. Ishikawa, S. Koshio, S. Yokoyama, Z. Yukun, R. S. Shadrack, S. Seo, T. Nguyen Duy Koha, A. Moss, S. Dossou, M. F. El Basuini y M. A. O. Dawood. 2021. Effect of substituting fish oil with camelina oil on growth performance, fatty acid profile, digestibility, liver histology, and antioxidative status of red seabream (*Pagrus major*). *Animals* 11: 1-17.
- Nasopoulou, C. y I. Zabetakis, 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT – Food Science and Technology* 47: 217–224.
- National Research of Council (NRC), 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington, DC, USA. pp. 376.
- Nguemeni, C., E. Gouix, M. Bourourou, C. Heurteaux y N. Blondeau. 2013. Alpha-linolenic acid: a promising nutraceutical for the prevention of stroke. *PharmaNutrition* 1: 1–8.

- Ní Eidhin, D., J. Burke y D. O'Beirne. 2003. Oxidative stability of  $\omega$ 3-rich camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread. *J. Food Sci.* 68: 345–353.
- Ofori-Mensah, S., M. Yıldız, M. Arslan y V. Eldem. 2020. Fish oil replacement with different vegetable oils in gilthead seabream, *Sparus aurata* diets: Effects on fatty acid metabolism based on whole-body fatty acid balance method and genes expression. *Aquaculture* 529: 735609.
- Oku, H., N. Koizumi, T. Okumura, T. Kobayashi, y T. Umino. 2006. Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: Effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream, *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 145: 168–178.
- Olsen, R. E. y E. Ringø. 1997. Lipid digestibility in fish: a review. *Recent Research Development in Lipid Research* 1: 199–265.
- Olsen, R.E., R. J. Henderson y E. Ringø. 1998. The digestion and selective absorption of dietary fatty acids in Arctic Charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture Nutrition* 4, 13–21.
- Peng, M., W. Xu, K. Mai, S., H. Zhou, Y. Zhang, Z. Liufu, K. Zhang y Q. Ai. 2014. Growth performance, lipid deposition and hepatic lipid metabolism related gene expression in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed diets with various fish oil substitution levels by soybean oil. *Aquaculture* 433: 442–449.
- Peng, X., Li, F., Lin, S., Chen, Y., 2016. Effects of total replacement of fish oil on growth performance, lipid metabolism and antioxidant capacity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International* 24, 145-156.
- Perez-Velazquez, M., D. M. Gatlin III, M. L. González-Félix y A. García-Ortega. 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., D. M. Gatlin III, M. L. González-Félix, A. García-Ortega, C. R. de Cruz, M. L. Juárez-Gómez y K. Chen. 2019. Effect of fishmeal and fish oil replacement by algal meals on biological performance and fatty acid profile of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀×*M. saxatilis* ♂). *Aquaculture*: 507, 83–90.
- Piedecausa, M. A., M. J. Mazón, B. García García y M. D. Hernández. 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 263: 211-219.
- Qiu, H., M. Jin, Y. Li, Y. Lu, Y. Hou y Q. Zhou. 2017. Dietary lipid sources influence fatty acid composition in tissue of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) by regulating triacylglycerol synthesis and catabolism at the transcriptional level. *PLoS ONE* 12: 1–19.
- Renna, M., A. Schiavone, F. Gai, S. Dabbou, C. Lussiana, V. Malfatto, M. Prearo, M. T. Capucchio, I. Biasato, E. Biasibetti, M. De Marco, A. Brugiapaglia, I. Zoccarato y L. Gasco. 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. *Journal of Animal Sciences and Biotechnology* 8 (57): 1–13.

- Røsjø, C., Nordrum, S., Olli, J. J., Krogdahl, A., Ruyter, B., Holm, H., 2000. Lipid digestibility and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed medium-chain triglycerides. *Aquaculture* 190, 65–76.
- Rueda-López, S., E. Martínez-Montaña y M. T. Viana. 2017. Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*; totoaba, *Totoaba macdonaldi*; and striped bass, *Morone saxatilis*. *World Aquaculture Society* 48: 156–165.
- Sarker, P. K., M. M. Gamble, S. Kelson y A. R. Kapuscinski. 2016b. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquaculture Nutrition* 22: 109–119.
- Sarker, P. K., A. R., Lanois, E. D. Livesey, K. P. Bernhard y M. L. Coley. 2016a. Towards sustainable aquafeeds: complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS ONE* 11(6): e0156684.
- Schönfeld, P. y L. Wojtczak, 2016. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research* 57: 943–954.
- Seong, T., H. Matsutani, Y. Haga, R. Kitagima y S. Satoh. 2019. First step of non-fish meal, non-fish oil diet development for red seabream, (*Pagrus major*), with plant protein sources and microalgae *Schizochytrium* sp. *Aquaculture Research* 50: 2460–2468.
- Shah, N. D. y B. Limketkai, 2017. The use of medium-chain triglycerides in gastrointestinal disorders. *Nutrition Issues Gastroenterology* 160: 20–28.
- Shah, M. R., G. A. Lutz, A. Alam, P. Sarker, M. A. Kabir-Chowdhury, A. Parsaeimehr, Y. Liang y M. Daroch. 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 30: 197–213.
- Singh, R., N. Gupta y V. K. Goswami. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 679–682.
- Solovyev, M. y E. Gisbert. 2016. Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 42: 1383–94.
- Sprague, M., J. Walton, P. J. Campbell, F. Strachan, J. R. Dick y J. G. Bell. 2015 Replacement of fish oil with a 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-smolts. *Food Chemistry* 185: 413–421.
- Swanson, D., R. Block y S. A. Mousa, 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition* 3: 1–7.
- Tandy, S., R. W. Chung, E. Wat, A. Kamili, K. Berge, M. Griinari y J. S. Cohn. 2009. Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia, and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 9339–9345.



- Taniguchi, A., K. Takano y I. Kamoi. 2001. Purification and properties of lipase from *Tilapia* intestine-VI. *Nippon Suisan Gakkaishi* 67: 78–84.
- Terzyan, S., C. S. Wang, D. Downs, B. Hunter y X. Zhang. 2000. Crystal structure of the catalytic domain of human bile salt activated lipase. *Protein Sci.* 9: 1783–1790.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11: 107–184.
- Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research* 41, 717–732.
- Tocher, D.R., M. B. Betancor, M. Sprague, R. E. Olsen y J. A. Napier. 2019. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: Bridging the gap between supply and demand. *Nutrients* 89: 1–20.
- Tocher, D.R., X. Zheng, C. Schlechtriem, N. Hastings, J. R. Dick y A. J. Teale. 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl  $\Delta 6$  desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41: 1003–1016.
- Toyes-Vargas, E.A., C. C. Parrish, M. T. Viana, L. Carreón-Palau, P. Magallón-Servín y F. J. Magallón-Barajas. 2020. Replacement of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil in diets for juvenile tilapia (var. GIFT *Oreochromis niloticus*) and its effect on growth, feed utilization and muscle lipid composition. *Aquaculture* 523: 735177.
- Tran, G., V. Heuzé y H. P. S. Makkar. 2015. Insects in fish diets. *Anim. Front.* 5, 37–44.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1: 10–57.
- Turchini, G. M., W. K. Ng y D. R. Tocher. 2010. Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 551 pp.
- Van Tilbeurgh, H., S. Bezzine, C. Cambillau, R. Verger y F. Carrière. 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1441: 173–184.
- 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.
- Xu, H., J. Wang, K. Mai, W. Xu, W. Zhang, Y. Zhang y Q. Ai. 2014. Dietary docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) ratio influenced growth performance, immune response, stress resistance and tissue fatty acid composition of 6juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier). *Aquaculture Research*: 741–757.
- Xu, X., H. Ji, I. Belghit y J. Sun. 2020. Black soldier fly larvae as a better lipid source than yellow mealworm or silkworm oils for juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*). *Aquaculture* 527: 735453.
- Yadav, R. P., R. K. Saxena, R. Gupta y W. S. Davidson. 1998. Rapid zymogram for lipase. *BioTechniques* 24: 754–756.

Zarantoniello, M., L. Bruni, B. Randazzo, A. Vargas, G. Gioacchini, C. Truzzi, A. Annibaldi, P. Riolo, G. Parisi, G. Cardinaletti, F. Tulli, y I. Olivotto. 2018. Partial dietary inclusion of *Hermetia illucens* (black soldier fly) full-fat prepupae in zebrafish feed: Biometric, histological, biochemical, and molecular implications. *Zebrafish* 15: 519–532.