



Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola

**Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez,
Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe
Nieto López, David A. Villarreal Cavazos,
Julián Gamboa Delgado, y Carlos A.
Martínez Palacios**

Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola
2022, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2022

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

- Autores del escrito. 2022. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios. Investigación e innovación en nutrición acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.473 ISBN: 978-607-27-1732-9. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias

Directorio

Dr. Santos Guzmán López
Rector

Dr. Juan Paura García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, y Carlos A. Martínez Palacios.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455
Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx
Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2022. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado, ©Carlos A. Martínez Palacios.

ISBN:978-607-27-1732-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores. El contenido es responsabilidad de los autores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

El Titarro (*Lathyrus cicera* L.) como una Alternativa Sustentable para el Reemplazo De Harina de Soya en Alimentos de *Oncorhynchus mykiss*

Toledo-Solís F.J.^{1,2*}, Yagüe S.³, Mateos-Aparicio I.⁴, Pérez V.⁵, Larrán A.M.³,
Moyano F.J.⁶, Fernández I.⁷

¹Centro de Investigaciones Costeras, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Calle Juan José Calzada s/n, 30500 Tonalá, Chiapas, México.

²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Av. Insurgentes Sur 1582, Alcaldía Benito Juárez, 03940 Ciudad de México, México.

³Centro de Investigación en Acuicultura, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Ctra. Arévalo, 40196 Zamarramala, Segovia, España.

⁴Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, España.

⁵Universidad de León, Campus Vegazana s/n, E-24071 León, España.

⁶Departamento de Biología y Geología, Universidad de Almería, 04120 Almería, España.

⁷Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía, Subida Radio Faro 50, 36390 Vigo, Pontevedra, España *Email: fj.toledos@gmail.com

Resumen

La sustentabilidad de la acuicultura se basa en la identificación e incorporación de nuevas materias primas alternativas (MPAs) para reemplazar la harina y/o aceite de pescado. Actualmente, se consideran distintas MPAs como la harina de soya, insectos o algas, entre otras. Sin embargo, la harina de soya es una de las harinas alternativas más ampliamente utilizada en la sustitución de la harina de pescado, importándose de países como EU, Argentina, Brasil, entre otros. Esto ocasiona una dependencia de las producciones de terceros países, el aumento de la huella de carbono, y un mayor costo de manufactura de los alimentos. Por lo tanto, es urgente la identificación de MPAs producidas localmente para sustituir la harina de soya. La harina de titarro (*Lathyrus cicera*) es una MPAs de producción local en España, y que ha sido seleccionada y caracterizada mediante un proceso que integró herramientas multiparamétricas. Y en este estudio, mediante una aproximación dosis-respuesta *in vivo*, se evaluó la sustitución de la harina de soya por la harina de titarro en dietas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). El experimento se realizó en un sistema de recirculación con parámetros controlados (temperatura 15°C, oxígeno disuelto de > 7 mg/L, etc.). Se utilizaron un total de 360 juveniles (de 10 ± 0.5 g) que fueron alimentados diariamente al 3% de su biomasa durante un periodo de 90 días con dietas donde el 0, 8, 16, 33, 66 y 100% de la harina de soya fue sustituido por harina de titarro (nombradas como Control, T8, T16, T33, T66 y T100, respectivamente). Al finalizar el ensayo se evaluó el crecimiento de los juveniles y los niveles postprandiales de glucosa y triglicéridos en plasma. Los resultados de crecimiento mostraron valores significativamente menores en todos los parámetros de crecimiento (peso húmedo, ganancia en peso, tasa de crecimiento instantáneo, factor de conversión, entre otros) solo cuando los peces fueron alimentados con la dieta T100

(ANOVA, $p>0.05$). Estos efectos pudieron estar inducidos por la presencia de factores anti-nutricionales (FANs) y/o polisacáridos no amiláceos (PNAs) en la harina de titarro. La caracterización de PNAs, indicó que la fracción total está representada mayormente por los monosacáridos de glucosa y arabinosa. En este sentido, en los resultados del análisis postprandial en plasma se observó un efecto de hipoglucemia en las dietas con mayor porcentaje de sustitución de la harina de soya (T66 y T100), sugiriéndose que los PNAs del titarro podrían limitar la digestión y/o absorción de otros carbohidratos. También, en el contenido de triglicéridos se observó una disminución en los niveles postprandiales a las 3 y 6 horas después de la alimentación en los peces alimentados con una dieta con sustitución mayor del 8%. A falta de resultados complementarios a nivel histológico y del valor nutricional del filete, los resultados sugieren que la sustitución de la harina de soya por harina de titarro es posible hasta el 66% en dietas para juveniles de trucha arcoíris sin efectos a nivel de crecimiento.

Palabras clave: *leguminosas, factores anti-nutricionales, polisacáridos no amiláceos, harinas vegetales, bioquímica sanguínea postprandial.*

Introducción

Una parte de la sustentabilidad de la acuicultura se basa en la identificación e incorporación de nuevas materias primas alternativas (MPAs), para remplazar la harina y/o aceite de pescado en las dietas de peces. A pesar de la aparición de nuevas MPAs, las harinas y/o subproductos vegetales siguen siendo las principales MPAs implementadas en la industria acuícola (Gatlin *et al.*, 2007; Kokou and Fountoulaki, 2018). Entre sus beneficios destacan los aportes nutricionales, producción en volumen y la accesibilidad en costos con respecto a otras harinas provenientes de algas (macro y/o micro) e insectos, entre otras. A la mayoría de las harinas de origen vegetal se les cuestiona por tener algunos efectos negativos (ej. Reducción del crecimiento y daños al sistema digestivo, entre otros) por el contenido en factores anti-nutricionales (FANs) (Król *et al.*, 2016; Hemre *et al.*, 2018). Sin embargo, muchos de los FANs pueden ser eliminados y/o su actividad reducida con la ayuda de tratamientos y/o procesos como la cocción o la fermentación, entre otros (Francis *et al.*, 2001; Dawood and Koshio, 2019).

En las dietas para peces, la soja se posiciona como una de las harinas vegetales alternativas más utilizadas para la sustitución de la harina de pescado (Nie and Hallerman, 2021) al disponer de un alto contenido en proteína y un perfil de aminoácidos bastante adecuado para los organismos acuáticos (Peres *et al.*, 2003). Esta leguminosa, es importada en volúmenes considerables de países productores como Estados Unidos, Brasil y Argentina, entre otros (De Visser *et al.*, 2014). Por lo tanto, es urgente la identificación de nuevas MPAs producidas localmente con la finalidad de sustituir la harina de soja en los alimentos acuícolas. Esto ayudaría a evitar la dependencia de las producciones de terceros países, al mismo tiempo que se podrían reducir los costos de manufactura y la huella de carbono en los alimentos ocasionada por la logística de esas importaciones.

En Europa y países como España, el sector acuícola desarrolla investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas MPAs que puedan ser incorporadas en los piensos, con especial interés en especies de importancia comercial como es la trucha arcoíris (Tomás-Almenar *et al.*, 2020). En la comunidad de Castilla y León, existen algunos cultivos locales que podrían ser MPAs para los piensos de esta especie. Por ello, en estudios previos realizados en esta comunidad, nueve semillas de leguminosas fueron seleccionadas, y sus propiedades nutricionales caracterizadas en laboratorio mediante diferentes análisis paramétricos. Entre estas, destacaron las propiedades de la harina de alverjón (*Vicia narbonensis*) y del titarro (*Lathyrus cicera*). Si bien ya se dispone de ciertos datos

sobre ensayos realizados con la primera en dietas de trucha arcoíris (Toledo-Solís *et al.*, 2022 *en revisión*), no ocurre así en el caso del titarro.

El cultivo del titarro se caracteriza por su alta adaptabilidad a diversos ambientes, llegándose a desarrollar en suelos pobres y de bajas precipitaciones, encontrándose cultivos situados en regiones del Mediterráneo, partes de la India y Norte de África (Hammer *et al.*, 2018). El titarro, como otras especies del género *Lathyrus*, ha formado parte de la alimentación humana y de los animales domésticos desde hace décadas (Ramachandra *et al.*, 2005). El consumo en humanos se abandonó porque se asoció al desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa, conocida comúnmente como latirismo, que se manifiesta como una parálisis en las extremidades inferiores, y que es debida a la presencia en las semillas del aminoácido no proteico β -N-oxalil-L- α ,-ácido diaminopropiónico (β -ODAP). (Sacristán *et al.*, 2015). En animales domésticos, la evaluación de los efectos de β -ODAP se ha centrado principalmente en cerdos, ovejas y aves de corral, encontrándose resultados contradictorios. Parte de los estudios encontraron efectos ligeros debido a un alto consumo de esta semilla durante un tiempo prolongado, mientras que otros estudios dichos efectos no se han observado (Hanbury *et al.*, 2000, Hanbury and Hughes, 2003; White *et al.*, 2002; Mullan *et al.*, 2009). Actualmente, se están retomando y promoviendo los cultivos del género *Lathyrus* para la alimentación en animales y como un recurso para establecer cultivos intercalados (policultivos), en los cuales se pueden conseguir mejores rendimientos ante los monocultivos establecidos (Vlachostergios *et al.*, 2018; Hammer *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la sustitución de la harina de soya por harina de titarro en juveniles de trucha arcoíris por medio de un estudio dosis-respuesta *in vivo*.

Materiales y Métodos

Autorización ética

El experimento cumplió con las directrices de experimentación animal de acuerdo al Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) de Percie du Sert *et al.* (2020) y el acuerdo 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, la directriz 86/609/UE del Consejo de la Unión Europea y la legislación Española (RD53/2013), para garantizar una experimentación animal ética y el bienestar de los peces. Por otra parte, el personal involucrado en el experimento está capacitado para el manejo de animales de experimentación según la Orden ECC/566/2015 de la legislación Española. Todos los procedimientos fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética del ITACyL (número de aprobación: 31/2018/CEEA).

Obtención de la harina de titarro

En la Comunidad de Castilla y León (España) fueron seleccionadas como potenciales candidatas para ser incorporadas en alimentos acuícolas nueve semillas de origen local, por su pertinencia nutricional, económica y ambiental. Dichas semillas se caracterizaron por diferentes análisis en relación a su contenido nutricional, biodisponibilidad de nutrientes y presencia de FANs, entre otros parámetros. Como resultado se encontró que la harina de titarro podría ser una candidata adecuada para continuar con una evaluación *in vivo* como alternativa a la harina de soya en alimentos para juveniles de trucha arcoíris (Toledo-Solís *et al.*, 2022 *en revisión*). Para la utilización de la semilla en las distintas pruebas, se molió hasta obtener una harina de tamaño de partícula menor a 500 μm .

Caracterización de polisacáridos no amiláceos (PNAs)

La determinación total de la fibra dietética (soluble e insoluble) se llevó a cabo según el método enzimático-gravimétrico de la AOAC 991.43. Los residuos gravimétricos se trataron con H_2SO_4 12 M a 35 °C durante 30 minutos, seguido de H_2SO_4 2 M a 100 °C durante 1 hora. Los azúcares neutros liberados de los polisacáridos no amiláceos (PNAs) se transformaron en acetatos de alditol con anhídrido acético en presencia de 1-metilimidazol y se cuantificaron por cromatografía de gases (GLC), utilizando como patrón interno β -D-alosa (Fluka), en un sistema de cromatografía Perkin-Elmer (Waltham, EE. UU.), equipado con un detector de ionización con llama de hidrógeno. La columna utilizada fue una SP-2330 (30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película) y como gas portador se utilizó nitrógeno. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 275 °C y la temperatura del horno de 235 °C. El contenido de ácido urónico se

determinó según el método colorimétrico del 3,5-dimetilfenol previamente adaptado a un lector de microplacas (Synergy™ HTX Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.), utilizándose como patrón estándar ácido galacturónico monohidrato (Merck). El cálculo total de PNAs se realizó mediante la suma de azúcares neutros y ácidos, expresándose en mg/g de materia prima seca.

Diseño experimental y condiciones de cultivo

Se realizó un experimento dosis-respuesta durante 90 días. Las dietas presentaron diferentes porcentajes de sustitución de la harina de soya por harina de titarro: 0, 8, 16, 33, 66 y 100% (nombradas como Control, T8, T16, T33, T66 y T100, respectivamente). Se utilizaron un total de 360 juveniles de trucha arcoíris con un peso húmedo medio de 10.4 ± 0.1 g y de una longitud furcal inicial (LFI) de 9.5 ± 0.1 cm. La distribución se hizo aleatoriamente (20 individuos/tanque y 3 tanques por dieta) en 18 tanques de 500 L conectados a un sistema de recirculación. El bioensayo se realizó bajo parámetros controlados de temperatura (15 °C), oxígeno disuelto (>7 mg/L) y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 horas. Las concentraciones de amonio y nitratos se monitorearon todos los días para mantenerlos por debajo de los valores tóxicos. La alimentación se realizó diariamente por las mañanas (entre las 08:00-09:00 horas) a saciedad aparente, utilizándose como máximo el 3% de la biomasa.

Formulación y elaboración de alimentos

En la Tabla 1 se muestra la formulación de las seis dietas experimentales. Los piensos se prepararon por extrusión en diferentes diámetros (2, 3.5 y 5 mm) de acuerdo con el tamaño de las truchas a lo largo del ensayo. La fabricación de los alimentos se realizó en la Unidad de Piensos Experimentales de la Universidad de Almería (Almería, España).

Tabla 1. Formulación, composición proximal y digestibilidad aparente de las dietas experimentales.

Ingredientes (g/100 g)	Dietas					
	Control	T8	T16	T33	T66	T100
Harina de pescado						
LT	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Harina de titarro	0.00	2.50	5.00	10.00	20.00	30.00
Harina de soya	30.00	27.50	25.00	20.00	10.00	0.00
Gluten de trigo	12.02	13.02	14.01	16.01	19.99	23.98
Harina de trigo	13.46	12.37	11.27	9.27	5.13	0.99
Aceite de pescado	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75
Aceite vegetal	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75
Lecitina de soya	1.45	1.43	1.40	1.35	1.25	1.14
Premix ^a	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Aglutinante ^b	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Metionina	0.52	0.54	0.54	0.56	0.56	0.56
Lisina	0.05	0.12	0.18	0.31	0.57	0.83
Total	100	100	100	100	100	100
Composición proximal (% de materia seca)						
Humedad	5.56 ± 0.33 ^a	3.98 ± 0.15 ^d	4.10 ± 0.25 ^{cd}	4.79 ± 0.35 ^{bc}	4.93 ± 0.30 ^{ab}	5.27 ± 0.11 ^{ab}
Proteína	42.67 ± 0.92	42.34 ± 0.38	42.34 ± 0.47	42.61 ± 1.60	42.43 ± 1.26	42.78 ± 0.63
Lípidos	20.82 ± 0.18 ^b	22.01 ± 0.33 ^a	21.06 ± 0.71 ^{ab}	20.86 ± 0.20 ^b	20.85 ± 0.16 ^b	20.21 ± 0.31 ^b
Fibra	1.91 ± 0.16	1.81 ± 0.20	1.69 ± 0.15	1.98 ± 0.14	1.91 ± 0.00	1.91 ± 0.18
Cenizas	8.17 ± 0.05	7.63 ± 0.25	8.46 ± 0.17	7.30 ± 1.05	7.12 ± 0.29	8.37 ± 0.25

^aVitamina y minerales premix TECNOVIT; ^bGuar gum; En las filas, las letras en el superíndice de los números indican diferencias entre dietas experimentales (ANOVA; prueba de tukey; $p < 0.05$; $n=3$).

Digestibilidad aparente

La digestibilidad aparente de la proteína se determinó utilizando el método de cenizas insolubles en ácido de Guelph modificado (Cho *et al.*, 1982), y el cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{CDAProteína (Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína)} = 100 - [(\text{marcador en dieta/marcador en heces}) \times (\% \text{ proteína en heces} / \% \text{ proteína en dieta}) \times 100]$$

Análisis proximal y perfil de aminoácidos

Se analizó la composición proximal en la harina y en las dietas experimentales. Los parámetros analizados se expresaron en porcentaje con relación a la materia seca. La determinación del

contenido de humedad, proteína y nitrógeno se realizó de acuerdo con los procedimientos oficiales de la AOAC (AOAC, 1990) y el Diario Oficial de la Unión Europea (OJEU, 2009). La humedad se calculó secando las muestras a 105 °C durante 24 horas hasta obtener un peso constante. El contenido en nitrógeno se analizó por el método Kjeldahl ($N \times 6.25$), los lípidos por extracción con diclorometano (Soxhlet) y el contenido de cenizas por calentamiento del residuo obtenido de la determinación de humedad en una mufla a 550 °C durante 24 horas. El contenido de fibra bruta, se calculó en las fracciones desengrasadas después de la digestión con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, y calentándose a 550 °C durante 3 horas. El cálculo del extracto libre de nitrógeno se realizó según Brett y Groves, (1979).

Para el análisis del perfil de aminoácidos en la harina de titarro y dietas experimentales se utilizaron 20 mg de muestras y todas las pruebas se realizaron por triplicado. Primeramente, se efectuó una hidrólisis con 1 ml de HCl 6 N durante 24 horas a 110 °C, posteriormente las muestras se neutralizaron con NaOH 6.5 N y se diluyeron diez veces con tampón de carga pH 2.2 (80-2037-67, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de intercambio iónico y de reacción continua post-columna con ninhidrina (Biochrom 30+, Cambridge, Reino Unido) para proporcionar un análisis de composición cualitativa y cuantitativa, utilizándose como patrón interno la norleucina.

Índices de crecimiento y eficiencia alimenticia

Durante el experimento se monitoreó el crecimiento de los peces cada 21 días, en términos de peso húmedo y longitud furcal, con el fin de ajustar la ración diaria de alimento. Para ello, los peces fueron anestesiados levemente con MS-222 (180 mg/mL), midiéndose la longitud furcal con un ictiómetro graduado (0.1 mm) y el peso húmedo con una balanza GRAM S3R-6KD (0.1 g). Todos los días se registró el consumo de alimento en cada tanque y la mortalidad. Para el análisis de digestibilidad aparente las heces se recogieron durante las últimas dos semanas del ensayo. Las heces de cada unidad experimental se almacenaron a -80 °C hasta su respectivo análisis. Al finalizar el experimento, se calcularon los siguientes índices de crecimiento de acuerdo a lo descrito en Tomás-Almenar *et al.* (2020).

Toma de muestras

Al finalizar el ensayo se tomaron muestras de sangre para el análisis bioquímico en plasma de tres peces de forma aleatoria. Los peces se muestrearon al momento de finalizar la alimentación (0 horas), a las 3 y 6 horas después de alimentar, utilizándose un total de 9 peces por tratamiento. La sangre se tomó de la vena caudal utilizando jeringas plásticas de 1 mL recubiertas con heparina de litio como anticoagulante, y se transfirieron a tubos de 1 mL con heparina de litio (MiniCollect®). El plasma se obtuvo por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Análisis postprandial

La determinación de glucosa y triglicéridos en plasma se realizó con kits de ensayo colorimétricos de glucosa-TR (BSIS17_E) y triglicéridos (BSIS31_E) según las instrucciones del fabricante (Spinreact®). La absorbancia se midió en microplacas de 96 pocillos utilizando un lector de microplacas (ELx800TM; BioTek Instruments, Inc., Vermont-EE.UU.).

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como valores medios \pm desviaciones estándar. Todos los datos se verificaron previamente en cuanto a normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad de la varianza (prueba de Bartlett). La comparación de los resultados se realizó mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. El nivel de significación en ambos se fijó en $p < 0.05$, y todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados y discusión

Características nutricionales del titarro

El contenido nutricional del titarro se ha discutido y/o analizado en estudios previos. Las primeras investigaciones se centraron en la composición química proximal, describiendo un contenido de proteína que oscila entre 22-31%, algo menos del 5% de lípidos y un alto contenido de carbohidratos (40-60%), dependiendo de la variedad, región y/o estacionalidad del cultivo (Hanbury *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002). En el presente estudio los resultados de la composición proximal y perfil de aminoácidos (Tabla 2), son similares a lo descrito en la literatura para varias leguminosas (Martín-Pedrosa *et al.*, 2016).

Tabla 2. Análisis de composición proximal y perfil de aminoácidos de la harina de titarro (*Lathyrus cicera*).

Composición proximal (% de materia seca)	
Proteína	23.82 ± 0.47
Lípido	2.03 ± 0.06
Carbohidratos (ELN)	70.37 ± 0.39
Cenizas	3.78 ± 0.07
Humedad	3.62 ± 0.22
Contenido de amino ácidos (g/100 g ingrediente)	
Ala	1.21 ± 0.05
Arg	1.88 ± 0.12
Asp	2.75 ± 0.06
Cys	0.15 ± 0.01
Glu	4.19 ± 0.12
Gly	0.97 ± 0.04
His	0.38 ± 0.02
Ile	0.72 ± 0.12
Leu	1.45 ± 0.09
Lys	1.75 ± 0.10
Met	0.24 ± 0.01
Phe	0.88 ± 0.04
Pro	1.89 ± 0.20
Ser	1.26 ± 0.02
Thr	0.91 ± 0.05
Tyr	0.71 ± 0.02
Val	1.07 ± 0.11

ELN, Extracto libre de nitrógeno.

Las semillas del género *Lathyrus* son deficientes en metionina, pero disponen de un alto aporte de lisina (Hanbury *et al.*, 2000; Grela *et al.*, 2012), como así se refleja en la Tabla 2. El perfil de los aminoácidos de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 3. La optimización del balance de aminoácidos en los alimentos acuícolas es esencial si se quiere lograr un crecimiento óptimo de los peces y una producción eficiente, particularmente cuando se alimenta con dietas que no están basadas en harina de pescado (Gatlin *et al.*, 2007). Las dietas experimentales no

presentaron diferencias significativas en los aminoácidos de metionina y lisina, tomando en cuenta la disposición de estos aminoácidos en la harina de titarro. En cuanto a los cinco aminoácidos (Ala, Asp, Glu, Gly, Leu) que presentaron diferencias significativas en las dietas, únicamente la leucina se encuentra catalogado como esencial en el crecimiento en trucha arcoíris y en todas las dietas experimentales está en mayor cantidad al requerimiento (Leu 1.4; Hardy *et al.*, 2002).

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales.

	Dietas					
	Control	T 8	T 16	T 33	T 66	T 100
Contenido de aminoácidos (g/100 g ingrediente)						
Ala	2.07 ± 0.01 ^a	2.07 ± 0.00 ^a	1.93 ± 0.11 ^{ab}	1.93 ± 0.03 ^{ab}	1.88 ± 0.07 ^{ab}	1.86 ± 0.02 ^b
Arg	2.10 ± 0.01	2.12 ± 0.05	1.97 ± 0.01	1.99 ± 0.01	1.92 ± 0.01	1.87 ± 0.02
Asp	3.40 ± 0.06 ^a	3.37 ± 0.03 ^a	2.96 ± 0.11 ^b	2.93 ± 0.06 ^b	2.78 ± 0.00 ^{bc}	2.69 ± 0.04 ^c
Cys	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.34 ± 0.00	0.35 ± 0.00
Glu	8.21 ± 0.11 ^{bc}	8.25 ± 0.08 ^{bc}	7.65 ± 0.25 ^c	8.07 ± 0.22 ^{bc}	8.54 ± 0.09 ^b	9.20 ± 0.08 ^a
Gly	1.91 ± 0.04 ^{ab}	1.90 ± 0.01 ^{ab}	1.95 ± 0.10 ^{ab}	2.02 ± 0.06 ^a	1.98 ± 0.02 ^{ab}	1.77 ± 0.05 ^b
His	1.03 ± 0.38	1.09 ± 0.44	1.52 ± 0.32	1.21 ± 0.08	1.31 ± 0.08	1.27 ± 0.09
Ile	1.77 ± 0.01	1.80 ± 0.10	1.65 ± 0.03	1.62 ± 0.06	1.65 ± 0.01	1.63 ± 0.13
Leu	2.89 ± 0.07 ^a	2.92 ± 0.03 ^a	2.63 ± 0.05 ^b	2.63 ± 0.07 ^b	2.64 ± 0.00 ^b	2.73 ± 0.05 ^{ab}
Lys	2.81 ± 0.06	2.84 ± 0.02	2.87 ± 0.12	2.73 ± 0.11	2.87 ± 0.05	2.95 ± 0.08
Met	1.13 ± 0.10	1.16 ± 0.10	1.03 ± 0.11	1.08 ± 0.04	1.17 ± 0.09	1.12 ± 0.03
Phe	1.96 ± 0.15	1.95 ± 0.20	1.98 ± 0.10	1.93 ± 0.02	1.96 ± 0.04	2.00 ± 0.02
Pro	1.08 ± 0.01	1.13 ± 0.02	1.07 ± 0.00	1.19 ± 0.05	1.17 ± 0.04	1.26 ± 0.03
Ser	1.38 ± 0.31	1.57 ± 0.31	1.26 ± 0.28	1.28 ± 0.36	1.23 ± 0.10	1.59 ± 0.29
Thr	1.28 ± 0.11	1.35 ± 0.12	1.13 ± 0.07	1.14 ± 0.12	1.11 ± 0.05	1.24 ± 0.12
Tyr	1.02 ± 0.03	1.12 ± 0.01	1.12 ± 0.19	1.10 ± 0.09	1.08 ± 0.02	1.16 ± 0.06
Val	2.42 ± 0.04	2.36 ± 0.05	2.19 ± 0.10	2.20 ± 0.09	2.24 ± 0.05	2.21 ± 0.13

En el titarro se ha evaluado el contenido de azúcares solubles (ej. Sucrosa, Ciceritol, Galactinol y Rafinosa, entre otros; Martín-Pedrosa *et al.*, 2016), indicando contenidos similares a los descritos en otras leguminosas. En este estudio, se caracterizó el contenido de PNAs y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. La fracción total (soluble + insoluble) se encuentra representada mayormente por los monosacáridos de glucosa (3.82 ± 0.36 mg/g de ingrediente) y arabinosa (2.79 ± 0.33 mg/g de ingrediente). La dificultad de digerir esta fracción de carbohidratos (PNAs) puede generar efectos negativos, tales como modificar la viscosidad del alimento, afectar

la fisiología y/o morfología del intestino y la composición de la microbiota intestinal (Sinha *et al.*, 2011).

Tabla 4. Contenido de polisacáridos no amiláceos en la harina de titarro (*Lathyrus cicera*).

PNAs (mg/g ingrediente)	Soluble	Insoluble	Total
Ácido galacturónico	0.46 ± 0.22	1.71 ± 0.20	2.28 ± 0.46
Arabinosa	0.84 ± 0.18	1.98 ± 0.18	2.79 ± 0.33
Fucosa	Nd	Nd	Nd
Galactosa	0.14 ± 0.04	0.24 ± 0.05	0.38 ± 0.05
Glucosa	0.79 ± 0.18	3.15 ± 0.32	3.82 ± 0.36
Manosa	0.26 ± 0.05	Nd	0.26 ± 0.05
Ramnosa	Nd	Nd	Nd
Xilosa	0.31 ± 0.13	0.68 ± 0.12	1.03 ± 0.17
Total	2.78 ± 0.46	7.68 ± 0.66	10.40 ± 0.84

PNAs, Polisacáridos no amiláceos. Nd, No detectado.

Índices de crecimiento

A pesar de que algunas especies del género *Lathyrus* se han utilizado como parte de la alimentación en humanos y en la crianza de animales (Hanbury *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002), existen pocos estudios que hayan evaluado su aporte nutricional y sus efectos en peces, limitándose a la especie de *L. sativus* (Barse *et al.*, 2004; Ramachandran *et al.*, 2005; Ramachandran y Ray, 2008). Los resultados en carpa (*Labeo rohita*) demostraron como las técnicas de pre-tratamiento tales como la fermentación, pueden mejorar la inclusión de la harina, que permitió una inclusión del 30% de la harina (*L. sativus*) sin afectar al crecimiento de las carpas. En el caso de la harina de titarro procedente de *L. cicera*, solamente se ha evaluado la digestibilidad aparente de la proteína en trucha arcoíris (Magalhães *et al.*, 2016). En dicho estudio se evaluaron el CDA de la proteína de seis tipos de leguminosas registradas y comercializados en la Unión Europea (PVD, 2022). La harina de titarro resultó con un CDA proteína de 0.969, el segundo mejor después del obtenido en la harina de guisante (*Pisum sativum*; CDA proteína de 1.000). También evaluaron el CDA proteína cuando las harinas se incorporaban al 30% en la dieta de referencia, resultando en este caso un valor de 0.917, mayor al valor obtenido en la dieta de referencia (CDA proteína 0.906). Los autores consideran que la harina de titarro podría ser un ingrediente potencialmente a utilizar en los alimentos de especies con hábitos carnívoros.

En el presente experimento, los resultados del crecimiento de trucha arcoíris alimentadas con titarro y la digestibilidad aparente de la proteína se muestran en la Tabla 5. Solo los peces alimentados con la sustitución total (100%) de harina de soya por harina de titarro (Dieta T100) presentaron unos valores significativamente menores en los parámetros de crecimiento como peso final (PF, 100.5 ± 5.8 g), longitud furcal final (LFF, 20.2 ± 0.4 cm), ganancia en peso (GP, $20.2 \pm 0.4\%$), tasa de crecimiento instantánea (TCI, 2.53 ± 0.07 %/día) y factor de conversión alimenticio (FCA, 1.00 ± 0.04), con respecto a los índices de crecimiento de los peces alimentados con la dieta Control (PF, 150.7 ± 2.3 g; LFF, 22.7 ± 0.2 cm; GP, 1357.8 ± 18.2 ; TCI, 2.98 ± 0.01 ; FCA, 0.79 ± 0.01 ; ANOVA, $p > 0.05$). La afectación del crecimiento en los peces por los altos porcentajes de inclusión y/o sustituciones de las harinas vegetales podrían deberse principalmente a la presencia de FANs, de carbohidratos no digeribles, o la baja digestibilidad de la proteína aportada por el titarro, entre otros (Francis *et al.*, 2001; Glencross *et al.*, 2012). Si bien en estudios anteriores la incorporación de un 30% de harina de titarro mostró resultados prometedores no afectando a la digestibilidad aparente de la proteína (Magalhães *et al.*, 2016), nuestros resultados mostraron que esta solo se ve reducida cuando la sustitución de la harina de soya por harina de titarro es del 100% (dieta T100).

Tabla 5. Índices de crecimiento y eficiencia en el uso del alimento en trucha arcoíris.

Dietas	Control	T 8	T 16	T 33	T 66	T 100
PI (g)	10.4 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.4 ± 0.1	10.3 ± 0.2	10.4 ± 0.1	10.3 ± 0.1
LFI (cm)	9.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Biomasa (g)	2075.8 ± 80.3 ^a	2019.73 ± 198.8 ^a	2035.2 ± 124.9 ^a	1978.2 ± 54.2 ^a	1950.2 ± 132.7 ^a	1352.6 ± 87.4 ^b
PF (g)	150.7 ± 2.3 ^a	144.9 ± 13.2 ^a	146.1 ± 8.3 ^a	142.1 ± 3.6 ^a	140.4 ± 8.7 ^a	100.5 ± 5.8 ^b
LFF (cm)	22.7 ± 0.2 ^a	22.4 ± 0.6 ^a	22.3 ± 0.4 ^a	22.0 ± 0.1 ^a	22.1 ± 0.3 ^a	20.2 ± 0.4 ^b
GP (%)	1357.8 ± 18.2 ^a	1313.7 ± 136.3 ^a	1308.6 ± 87.1 ^a	1285.4 ± 36.6 ^a	1254.6 ± 97.7 ^a	871.9 ± 60.1 ^b
TCI (%/día)	2.98 ± 0.01 ^a	2.94 ± 0.11 ^a	2.94 ± 0.07 ^a	2.91 ± 0.04 ^a	2.89 ± 0.08 ^a	2.53 ± 0.07 ^b
FCA	0.79 ± 0.01 ^a	0.80 ± 0.03 ^a	0.80 ± 0.02 ^a	0.81 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.04 ^b
FC	1.29 ± 0.02 ^a	1.29 ± 0.02 ^a	1.31 ± 0.01 ^a	1.33 ± 0.01 ^a	1.30 ± 0.03 ^a	1.23 ± 0.01 ^b
IH (%)	1.42 ± 0.12 ^a	1.35 ± 0.04 ^{ab}	1.30 ± 0.08 ^{ab}	1.20 ± 0.10 ^{ab}	1.13 ± 0.02 ^b	1.29 ± 0.09 ^{ab}
IV (%)	12.00 ± 0.90	11.81 ± 0.58	11.16 ± 0.28	10.87 ± 0.25	10.19 ± 2.62	11.69 ± 1.52
Digestibilidad aparente de la proteína (%)						
CDAproteína ¹	92.89 ± 0.18 ^{a,b}	91.66 ± 0.18 ^{b,c}	94.38 ± 0.52 ^a	91.91 ± 0.98 ^b	93.88 ± 0.38 ^a	90.03 ± 0.84 ^c

Valores expresados en media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA, $p > 0.05$; $n=3$). PI, peso inicial (g); LFI, longitud furcal inicial (cm); PF, peso final (g); LFF, longitud furcal final (cm); GP, ganancia en peso (%); TCI, tasa de crecimiento instantánea (%/día); FCA, factor de conversión alimenticio; FC, Factor de condición; Índice hepatosomático (%), Índice viscerosomático (%). ¹Coefficiente de digestibilidad aparente de la proteína.

En estudios previos se ha evaluado la incorporación de *L. sativus* en dietas para larvas de carpas (*Labeo rohita*) en porcentajes de 10 al 40% cuando esta no había sido tratada o fermentada. Se reporta que es posible incorporar en la fórmula hasta un 30% de la harina de *L. sativus* cuando es fermentada sin verse afectado el crecimiento, en comparación con la inclusión del 10% en condiciones normales de las semillas (Ramachandran *et al.*, 2005). Además de la fermentación, también se han ensayado otros pre-tratamientos en *L. sativus*, como la extrusión, germinación y el auto-clavado. La fermentación y extrusión son tratamientos efectivos en la remoción y/o reducción de FANs y en la eliminación del agente neurotóxico β -ODAP (Ramachandran y Ray, 2008; Sacristán *et al.*, 2015). Dichos resultados han sugerido la posibilidad de conseguir altos porcentajes de inclusión y/o sustitución en los alimentos para peces, sin tener efectos adversos por ser una de las especies con menor contenido del agente β -ODAP (Llorent-Martínez *et al.*, 2017). En el presente estudio, se ha observado que un alto porcentaje de sustitución de la harina de soja por

titarro en alimentos para trucha arcoíris es posible hasta en un 60%, incluso sin pretratamiento con fermentación. Si bien, no se observaron posibles efectos de latirismo en los peces, serán necesarios estudios más específicos para confirmar la ausencia del compuesto en el filete y la enfermedad en los animales.

Análisis postprandial de glucosa y triglicéridos

Los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma se muestran en la Tabla 6. Tras la alimentación, se observa un efecto de hipoglucemia en los peces alimentados con los mayores porcentajes de sustitución de harina de soya por harina de titarro (Dietas T66 y T100) cuando se comparan con los valores obtenidos en los peces alimentados con la dieta Control. La probable explicación de estos resultados podría estar relacionada con el tipo de carbohidratos presente en los alimentos, en donde los PNAs son digeridos con más dificultad en comparación con los carbohidratos de tipo sacáridos (ej. monosacáridos, disacáridos, polisacáridos) y/o almidón, que son mayormente digeribles y de fácil absorción (Krogdahl *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presencia de PNAs podría estar relacionada con el nivel postprandial de glucosa en sangre y el menor crecimiento en los peces alimentados con la dieta T100.

Ante un exceso de glucosa en sangre, este se puede almacenar en reservas de glucógenos o bien convertirse en lípidos, mediante las rutas metabólicas de glucogénesis y lipogénesis, respectivamente (Polakof *et al.*, 2012). En este estudio, únicamente se midieron los niveles de triglicéridos en plasma, los cuales presentan diferencias significativas con el incremento de la sustitución de la harina de soya por titarro, comparados con los valores obtenidos en los peces alimentados con la dieta Control, y proporcionales al nivel de glucosa en sangre. Estas diferencias se aprecian únicamente en los puntos de muestreo de 3 y 6 horas después de la alimentación. De qué modo la sustitución de harina de soya por harina de titarro altera el perfil de triglicéridos postprandial aún es desconocido, y estudios posteriores son necesarios para identificar los mecanismos involucrados.

Tabla 6. Análisis postprandial de glucosa y triglicéridos en plasma de trucha arcoíris alimentadas con las dietas experimentales.

Parámetros	Dietas	Tiempo (horas)		
		0	3	6
Glucosa (mg/dL)	Control	100.2 ± 13.2 ^a	100.4 ± 10.2 ^{ab}	79.9 ± 2.4 ^{ab}
	T8	93.5 ± 12.0 ^a	117.3 ± 12.1 ^a	71.4 ± 5.2 ^{bc}
	T16	81.7 ± 2.9 ^{ab}	90.5 ± 7.8 ^{bc}	86.3 ± 4.6 ^a
	T33	81.1 ± 8.5 ^{ab}	80.5 ± 3.9 ^{bc}	71.5 ± 8.7 ^{bc}
	T66	66.9 ± 7.2 ^b	73.6 ± 10.0 ^c	69.5 ± 6.3 ^{bc}
	T100	67.8 ± 5.3 ^b	73.8 ± 7.5 ^c	62.5 ± 3.1 ^c
Triglicéridos (mg/dL)	Control	273.6 ± 85.6	377.8 ± 48.0 ^a	369.6 ± 52.2 ^a
	T8	225.6 ± 29.8	229.7 ± 36.5 ^b	314.8 ± 31.3 ^{ab}
	T16	260.1 ± 43.9	213.3 ± 49.7 ^{bc}	292.6 ± 12.1 ^b
	T33	225.6 ± 68.8	223.0 ± 20.8 ^{bc}	180.3 ± 14.6 ^c
	T66	260.1 ± 43.9	203.7 ± 48.3 ^{bc}	177.3 ± 35.5 ^c
	T100	225.6 ± 68.8	134.8 ± 24.7 ^c	219.3 ± 12.3 ^c

Valores expresados en media ± desviación estándar. Las letras en el superíndice de cada columna indican diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA, $p > 0.05$; $n=3$).

Conclusiones

Hasta el momento, los resultados de crecimiento sugieren que la harina de soya se podría reemplazar hasta un 66% por la harina de titarro en los alimentos de la etapa juvenil de trucha arcoíris. No obstante, aún son necesarios otros estudios para determinar la seguridad en la sustitución de la harina de soya por harina de titarro, como son el análisis histológico del sistema digestivo (hígado, intestino proximal y distal) y/o los relacionados con la calidad nutricional del filete (composición proximal y perfil de aminoácidos). También como perspectivas de futuro importantes se considera la evaluación de los perfiles de ácidos grasos en músculo, así como los posibles pre-tratamientos de la harina de titarro para reducir y/o eliminar los FANs y mejorar la bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad de nutrientes (ej. carbohidratos no digeribles). Sin duda, los beneficios en la utilización de materias alternativas de producción local como el titarro son diversos, destacando que el proceso de manufactura presenta un menor costo de producción y la activación de la economía circular. También ayudaría reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂) por las importaciones y a evitar la dependencia de materias primas de terceros países.

Referencias

- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA.
- Barse A.V., Jadhao S.B., Sahu N.P., Srivastava P.P., Jain K.K., Pal, A.K. (2004). Responses of *Labeo rohita* to dietary *Lathyrus sativus* seeds. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 127–130. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.127>
- Brett J.R. and Groves T.D.D. (1979). Physiological energetics, *Fish Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60029-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60029-1)
- Cho C., Slinger S., Bayley H. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 25–41. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5)
- Dawood, M.A. and Koshio, S. (2019). Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Rev. Aquac.* 12, 987–1002. <https://doi.org/10.1111/raq.12368>
- De Visser C.L.M., Schreuder R., Stoddard F. (2014). The EU's dependency on soya bean import for the animal feed industry and potential for EU produced alternatives. *OCL*. 21, 4, D407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2014021>
- Francis G., Makkar H.P., Becker K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. 199, 197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gatlin D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Glencross B., Rutherford N., Bourne N. (2012). The influence of various starch and nonstarch polysaccharides on the digestibility of diets to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 356–357, 141–146.
- Grela E.R., Rybiński W., Matras J., Sobolewska S. (2012). Variability of phenotypic and morphological characteristics of some *Lathyrus sativus* L. and *Lathyrus cicera* L. accessions and nutritional traits of their seeds. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 59, 1687-1703. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9791-5>
- Hammer K., Laghetti G., Drenzo P., Castelli A. (2018). Resources and opportunities for re-establishing *Lathyrus cicera* L. as a multipurpose cultivated plant. *Genet Resour Crop Evol.* 66, 523-544. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0717-3>
- Hanbury C. and Hughes B. (2003). *Lathyrus cicera* as quality feed for laying hens. *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 3. pp. 44-46. CLIMA, University of Western Australia.
- Hanbury C.D., White C.L., Mullan B.P., Siddique K.H.M. (2000). A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 1-27. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00186-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00186-3)
- Hardy, R.W. (2002) Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Webster, C.D. and Lim, C., Eds., *Nutrient requirements and feeding of aquaculture fish*, CAB International Publishers, New York, 184-202. doi:10.1079/9780851995199.0184

- Hemre G.-I., Amlund H., Aursand M., Bakke A.M., Olsen R.E., Ringø E., Svihus B., Bernhoft A., Jenssen B.M., Møretrø T., Nesse L.L., Torrissen O. (2018). Criteria for safe use of plant ingredients in diets for aquacultured fish. *Eur. J. Nutr. Food Saf.* 8, 240–242. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2018/43861>
- Kokou F. and Fountoulaki E. (2018) Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture*, 495, 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.003>
- Krogdahl Å., Hemre G.-I., Mommsen T. (2005), Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11: 103-122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- Król E., Douglas A., Tocher D.R., Crampton V.O., Speakman J.R., Secombes C.J., Martin S.A.M. (2016). Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics* 17, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2473-0>
- Llorent-Martínez E.J., Ortega-Barrales P., Zengin G., Mocan A., Simirgiotis M.J., Ceylan R., Uysal S., Aktumsek A. (2017). Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: Potential sources of bioactive compounds for the food industry. *Food Chem. Toxicol.* 107, 609-619. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.002>
- Magalhães S.C.Q., Cabrita A.R.J., Valentão P., Andrade P.B., Rema P., Maia M.R.G., Valente L.M.P., Fonseca A.J.M. (2016). Apparent digestibility coefficients of European grain legumes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult Nutr.*, 24:332–340. <https://doi.org/10.1111/anu.12564>
- Martín-Pedrosa M., Varela A., Guillamon E., Cabellos B., Burbano C., Gomez-Fernandez J., de Mercado E., Gomez-Izquierdo E., Cuadrado C., Muzquiz, M. (2016). Biochemical characterization of legume seeds as ingredients in animal feed. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14, 1, e0901. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016141-7450>.
- Mullan B.P., Pluske J.R., Trezona M., Harris D.J., Allen J.G., Siddique K.H.M., Hanbury, C.D., Barneveld R.J. Van Kim, J.C. (2009). Chemical composition and standardised ileal digestible amino acid contents of *Lathyrus (Lathyrus cicera)* as an ingredient in pig diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.07.005>
- Nie P., Hallerman E. (2021). Advancing the sustainability of aquaculture. *Rev. Aquac.* 13, 781–782. <https://doi.org/10.1111/raq.12548>
- OJEU. (2009). Laying down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of Feed, Commission Regulation (EC) No 152/2009. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/152/oj> (accessed on 01 Feb 2022).
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., *et al.* (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Experimental Physiology*. 105, 1459– 1466. <https://doi.org/10.1113/EP088870>
- Peres H., Lim C., Klesius P.H. (2003). Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 225, 67–82. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00289-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00289-8)
- Polakof S., Panserat S., Soengas J.L., Moon T.W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol.* 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>

- PVD. (2022). Plant Variety Database - European Commission. Retrieved from http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm (accessed on 01 Feb 2022).
- Ramachandran S., & Ray A.K. (2008). Effect of different processing techniques on the nutritive value of grass pea, *Lathyrus Sativus* L., seed meal in compound diets for indian major carp rohu, *Labeo Rohita* (Hamilton), Fingerlings. Corpus ID: 85741128. <https://doi.org/10.2478/s10086-008-0016-2>
- Ramachandran S., Bairagi A., Ray A.K. (2005). Improvement of nutritive value of grass pea (*Lathyrus sativus*) seed meal in the formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings after fermentation with a fish gut bacterium 96, 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.002>
- Sacristán M., Varela A., Pedrosa M.M., Burbano C., Cuadrado C., Legaz M.E., Muzquiz M. (2015). Determination of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid and homoarginine in *Lathyrus sativus* and *Lathyrus cicera* by capillary zone electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.*, 95: 1414-1420. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6792>
- Sinha A.K., Kumar V., Makkar H.P.S., De Boeck G., Becker K. (2011). Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Toledo-Solís F.J., Hilerio-Ruíz A.G., Martínez P.F., Barrios A., Aznar M.J., Larrán A.M., Fernández I., Moyano F.J. (2022). Selection and improvement of 1 alternative raw materials for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquafeeds through a multiparametric screening tool. *Anim. Feed Sci. Technol.* ANIFEE-D-21-00721R1 in review.
- Tomás-Almenar C., Toledo-Solís F.J., Larrán A.M., de Mercado E., Alarcón F.J., Rico D., Martín-Diana A.B., Fernández I. (2020). Effects and safe inclusion of narbonne vetch (*Vicia narbonensis*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: Towards a more sustainable aquaculture. *Animals.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ani10112175>
- Vlachostergios D.N., Lithourgidis A.S., Dordas C.A. (2018). Agronomic, forage quality and economic advantages of red pea (*Lathyrus cicera* L.) intercropping with wheat and oat under low-input farming. *Grass Forage Sci.* 73: 777– 788. <https://doi.org/10.1111/gfs.12348>
- White C.L., Hanbury C.D., Young P., Phillips N., Wiese S.C., Milton J., Davidson R.H., Siddique K., Harris D. (2002). The nutritional value of *Lathyrus cicera* and *Lupinus angustifolius* grain for sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 99, 45-64. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00035-4)

Comparative Analysis of Soybean Meal Effects in Commercial Strains of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

Tsung-Yu Tsai^a, Hector Hernandez^b, Kenneth E. Overturf^c, and Madison S. Powell^{a*}

^aAquaculture Research Institute, University of Idaho, Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA

^bLaboratorio de Producción Acuícola, UNAM-Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Iztacala, México

^cUSDA-ARS, Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA

*Correspondence author: mpowell@uidaho.edu; +1(208)-837-9096

Summary

A strain of rainbow trout (CX strain) at the Hagerman Fish Culture Experiment Station has been selected for growth on a plant-based diet for ten generations. We compared fish from the CX strain that were age (CXA) and size (CXS) matched to three commonly available commercial strains selected for growth (RBT1, RBT2, RBT3). We compared differences in overall growth, oxidative stress and intestinal inflammation between fish fed a fishmeal (FM) or soybean-meal (SBM) diet for 12 weeks. Fish of each strain were randomly assigned to FM or SBM diet groups and fed daily to satiation. Tissues from each experimental group were sampled every four weeks to assess gene expression and growth parameters. Both CX strains had higher growth rates compared with similar feed consumption among all groups. Expression of intestinal and hepatic biomarkers for oxidative stress varied between liver and intestine. Expression varied between CXA and CXS fish despite being from the same strain indicating size at age affects gene expression and care should be taken when comparing different strains with different growth rates. Expression of calcium binding protein S100I2 in the intestine was elevated initially at 4 weeks, diminished at 8 weeks, then elevated again by 12 weeks. This pattern was also observed in intestinal SOD expression and GPx expression in the liver. Overall, these results provide further information on current commercial strains of rainbow trout to help improve the utilization on plant protein sources in their diets.

Keywords: *Enteritis, Rainbow trout, Salmonids, soybean meal, S100 gene*

1. Introduction

World aquaculture production is growing rapidly and playing an important role in providing animal protein for human consumption (FAO, 2018). Currently, the cost of fishmeal is increasing with rising world demand and it is the primary cost consideration in fish feeds. To help with limited fishmeal quantities, plant protein ingredients have been considered as protein substitutes in fish diets. Plant protein sources such as soybean meal (SBM) provide an abundant, more sustainable and an affordable alternative to fishmeal in aquafeeds. However, there are some concerns with replacing fishmeal (FM) with SBM in carnivorous fish, as it often contains anti-nutritional factors (ANFs) such as saponins resulting in distal intestine inflammation referred to as soybean meal induced enteritis (SMIE). This inflammatory response is characterized by intestinal fold height shortening, thickening of the lamina propria and submucosa thickening which is concomitant with infiltration of granulocytes (Baeverfjord & Krogdahl, 1996; Burrells *et al.*, 1999; Knudsen *et al.*, 2007; Romarheim *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). In salmonids, replacing fishmeal with plant-based ingredients also raises concerns with carbohydrate metabolism changes because fish are generally considered “glucose intolerant” (Geay *et al.*, 2011; Panserat *et al.*, 2009). Despite soybean meal being a more sustainable and economical protein source and having an advantageous amino-acid profile, the inflammatory responses observed in some aquaculture species such as Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) limit soybean meal’s utilization to replace fishmeal as an alternative ingredient (Blaufuss *et al.*, 2019; Collins *et al.*, 2013; Krogdahl *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

Numerous studies have concluded that distal intestine enteritis can be attributed to various levels of ANFs remaining in plant-based meals used in high protein diets for salmonids (Krogdahl *et al.*, 2010; Venold *et al.*, 2012). One strategy to help reduce SMIE when FM is replaced by plant-based proteins, is to increase overall protein availability thus reducing the portion of plant-based proteins used and minimizing the ANFs in the diet (Gatlin *et al.*, 2007). There is also evidence that exposure of RBT to dietary challenges during early stages affects acceptance and utilization of feeds in later life stages (Balasubramanian *et al.*, 2016; Geurden *et al.*, 2013). Although ANFs have been described as one factor in a plant-based diet affecting growth (Krogdahl *et al.*, 2010), an unbalanced fatty acid profile in plant-based diets has also been shown to affect fish immunity (Turchini *et al.*, 2010). Continually changing alternative feed formulations using plant-based proteins and oils to substantially or totally replace fishmeal and fish oil continues to be problematic

while trying to avoid impairing growth performance and survival in rainbow trout (Boucher *et al.*, 2012; Callet *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2003).

Genetic selection is another approach to help improve growth and utilization of plant-based feed in carnivorous fish. In rainbow trout, some genotypes have been observed to grow and survive better than others while fed a plant-based diet (Boucher *et al.*, 2012; Callet *et al.*, 2021). In addition, one strain of rainbow trout has been specifically selected for growth on an all-plant protein diet for over decade (Blaufuss *et al.*, 2019; Overturf *et al.*, 2013). This selected strain of rainbow trout (the CX strain) shows resistance to SMIE and a reduction in inflammatory responses in the distal intestine (Blaufuss *et al.*, 2019).

In this study, we compared three current commercial strains of rainbow trout to the CX strain of rainbow trout in a 12-week feeding trial. We wanted to assess how different strains of rainbow trout might show differences in resistance to SMIE and differences in utilization of plant proteins when compared to a fishmeal diet. To understand the effect of this dietary alteration on oxidative stress, expression levels of three genes (SOD, superoxide dismutase; glutathione peroxidase, GPx; and catalase) were compared in the liver and distal intestine in each RBT strain during each time point. We also examined calcium-binding protein genes expressed in the intestine (S100I2) and in the liver (S100V2) as inflammatory markers.

2. Material and Methods

2.1. Diets

Two experimental diets were formulated to provide 40% digestible protein and 20% crude lipid containing either fishmeal (FM diet) or soybean meal (PM diet) as the primary protein source (Table 1). Both diets were balanced for digestible protein and supplemented with essential amino acids to reach or exceed known nutrient requirements (NRC *et al.*, 2011).

Table 1. Formulations and proximate composition of control and experimental diets used in a 12 week, comparative feeding trial of rainbow trout strains.

Ingredient	FM	PM
Menhaden Fish Meal	30.00	0.00
Soybean meal	0.00	40.00
Chicken meal	11.50	11.50
Corn protein concentrate	11.50	11.50
Menhaden fish oil	14.72	16.35
Wheat gluten meal	0.16	1.30
Wheat flour	23.29	5.54
Lecithin	1.00	1.00
Stay-C 35	0.15	0.15
Vitamin premix ARS 702	1.00	1.00
TM ARS 640	0.10	0.10
NaCl	0.28	0.28
Magnesium Oxide	0.06	0.06
Potassium chloride	0.56	0.56
Monocalcium phosphate	0.60	4.80
Choline chloride 50%	1.00	1.00
DL-Methionine	0.33	0.63
Lysine HCl	2.17	2.56
Threonine	0.40	0.49
Taurine	1.00	1.00
Yttrium oxide	0.10	0.10
Astaxanthin	0.08	0.08
TOTAL	100.00	100.00
Proximate analysis (analyzed)		
Protein (%DM)	46.7	48.0
Lipid (%DM)	18.7	17.6

2.2. Fish culture and feeding

Three, same age, commercial strains of rainbow trout (RBT1, RBT2, RBT3) and size-matched Hagerman selected strain rainbow trout (CXS; approximately 2 weeks younger) collectively averaging 6.8 ± 0.49 g were stocked separately into 140 L poly tanks along with age-matched Hagerman strain rainbow trout (CXA) averaging 7.87 ± 0.14 g. Fish from each strain were

randomly assigned to 4 replicate tanks (2 tanks/diet, 30 fish/tank) in a flow-through system with spring water inflow. The water temperature was maintained at 15 °C with a 14:10 light: dark cycle during the experiment. Tanks were randomly assigned the FM or PM diet and fed twice daily to apparent satiation, 6 days per week, for 12 weeks. All fish were counted and bulk weighed every 4 weeks.

2.3. Sample collection

Initially and at weeks 4, 8, and 12, five fish from each tank were euthanized with MS-222 (250 ppm, buffered to pH 7.4; Western Chemical Co., Ferndale, WA). Samples of distal intestine and liver (~100 mg) were removed from each fish and placed in 1 ml TRIzol[®] (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and stored frozen at -80 °C until RNA was extracted for gene expression.

2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

For gene expression analysis, total RNA from sample tissues were extracted in the TRIzol[®] reagent. The liver or distal intestine tissues were put in 2-mL round-bottom centrifuge tubes and homogenized in a bead mill (MixerMill 200, Retsch GmbH, Hann, Germany). After homogenization, tubes were centrifuged at 12,000 g at 4 °C for ten minutes and the supernatant transferred to new 1.5 mL tubes. Chloroform (200 ul) was added to each tube and vigorously shaken for 15 seconds before incubation at room temperature for ten minutes. Tubes were then centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 15 minutes, and the supernatant transferred to a new 1.5 mL tube. Isopropanol (500 ul) was added and mixed well before incubation at -20 °C overnight. RNA was pelleted by centrifuging at 12,000 g at 4 °C for 10 minutes, then washed with cold 75% ethanol, and resuspended in nuclease-free water. RNA quantity and purity were examined spectrophotometrically using a Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). RNA sample concentrations were adjusted with nuclease-free water to 100 nM, treated with DNase (DNase I, Invitrogen, Carlsbad, USA), and reverse transcribed into cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) using the manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were stored at -80 °C for further analysis.

2.5. Quantitative PCR and data analysis

All samples were run in duplicate using a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Fast SYBR[™] Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA) was used according to the manufacturer's instructions along with 40nM of each primer and 10 ng of template cDNA. After amplification, a melt curve was used to check the specificity of the

qPCR product. A standard curve with a 7-point, fivefold dilution series was used with pooled total RNA from all samples. Expression efficiencies ranged from 97-103%. Primers for reference and target genes are shown in Table 2. Target genes were normalized against the reference gene RPS15 and quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Growth parameters and gene expression were analyzed with one-way and two-way ANOVA using the “AOV” procedure in R Studio® version 1.2.1335 (R Studio, Inc, Boston, MA), with “Tukey HSD” *post-hoc* tests when significant differences were observed. Significance was defined at $\alpha < 0.05$ for all statistical tests.

Table 2. Primer sequences of rainbow trout genes used for qPCR in a 12 week, comparative feeding trial of rainbow trout strains.

Gene	Accession	Primers
SOD ¹	NM_001124329	<i>f. GGC ACG AGG GCA AGT AGG A</i> <i>r. GCC TTT GAG CAC GCA AAC A</i>
GPx ²	AF281338	<i>f. CGC CCA CCC ACT GTT TGT</i> <i>r. GCT CGT CGC TTG GGA ATG</i>
S100I2	XM_021598338.1	<i>f. GCT TGG AGA GAT CAT GGG GAA AA</i> <i>r. GCC ATC TGA GTT AGC GTC CA</i>
S100V2	XM_021572132.1	<i>f. TTA CGA CTG GAG CGT CAG A</i> <i>r. CCT CCA GAA GTG ATT GAA GGT G</i>
Catalase	XM_021557350.2	<i>f. GGC TTT GCA GTT AAG TTC TAC</i> <i>r. AGC ATT GCG TCC CTG ATA AA</i>
RPS-15	NM_001165174.2	<i>f. ACA GAG GTG TGG ACC TGG AC</i> <i>r. AGG CCA CGG TTA AGT CTC CT</i>

¹ SOD, superoxide dismutase; ² GPx, glutathione peroxidase

3. Results

3.1. Growth performance

On the FM diet, CXA fish averaged the highest final weight (Table 3). On PM diet, both CXA and CXS fish showed higher final weight compared to the commercial strains, and RBT3 showed significantly lower final mass despite a greater feed intake. Although not significant, the CXA fish fed both the FM and PM diets had a lower FCR compared to the other strains. The survival rate was between $0.76\text{-}0.93 \pm 0.02$ % with no significant difference among strain and diet.

Table 3. Growth and feeding performance of rainbow trout strains fed a fishmeal or plant meal diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets.

Diet	Strain	Initial Mass (g)	Final Mass (g)	Weight Gain (%)	SGR ¹	Feed Intake ²	FCR ³
Fishmeal	CXS	7.47	128.83 ^b	1624 ^b	3.37 ^b	1.71	0.96
	CXA	7.87	194.95 ^a	2377 ^a	3.80 ^a	1.46	0.76
	RBT1	4.88	131.50 ^b	2592 ^a	3.91 ^a	1.70	0.80
	RBT2	7.25	137.66 ^b	1798 ^b	3.50 ^b	1.61	0.86
	RBT3	7.27	137.54 ^b	1790 ^b	3.49 ^b	1.74	0.85
Plant meal	CXS	7.47	152.38 ^x	1939 ^{xy}	3.58 ^x	1.73 ^{xy}	0.91
	CXA	7.87	155.09 ^x	1870 ^{yz}	3.54 ^{xy}	1.52 ^{xy}	0.76
	RBT1	4.88	120.28 ^y	2362 ^x	3.80 ^x	1.64 ^{xy}	0.88
	RBT2	7.25	116.28 ^y	1503 ^{yz}	3.28 ^y	1.48 ^y	1.05
	RBT3	7.27	112.74 ^y	1449 ^z	3.24 ^y	1.92 ^x	0.99
Pooled		0.53	7.66	123.5	0.07	0.04	0.03
SEM							
P	Strain		<0.001	<0.001	<0.001	0.006	0.27
	Diet		0.005	0.007	0.008	0.78	0.25
	S × D		0.004	0.014	0.007	0.57	0.72

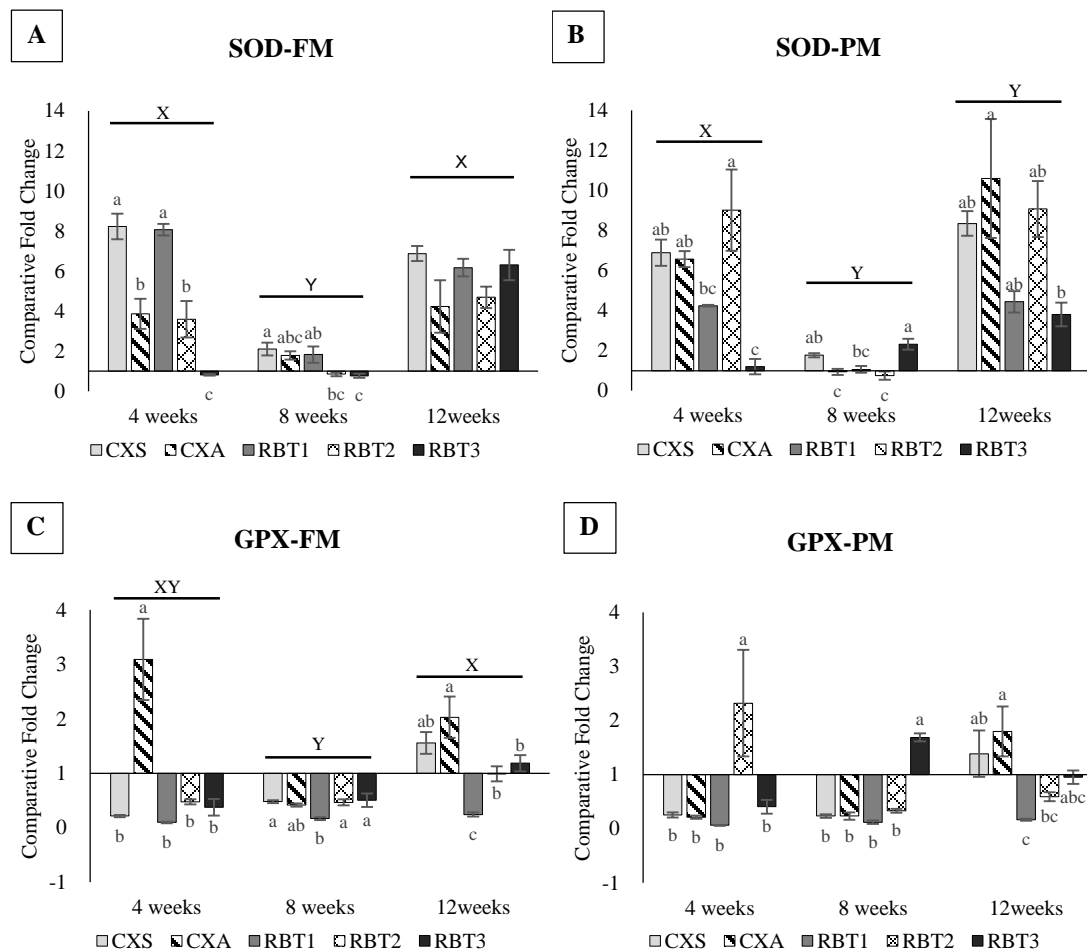
¹ Specific Growth Rate, = $100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / t$; W_f : final fish body weight, W_i : initial fish body weight, and t : total number of days of feeding

² Feed Intake, = g dry feed consumed / average fish mass (g) / culture days

³ Feed Conversion Ratio, = g dry feed consumed / g wet weight gained

3.2. Gene expression

In the distal intestine, overall expression of SOD in both the FM and PM diet fed fish was significantly higher at week 4 and week 12 compared to week 8. With the FM diet, expression of SOD in CXS and RBT1 fish was higher than expression observed in CXA, RBT2 and RBT3 strains at 4 weeks but not significantly different among strains by week 12 (Fig. 1A). On the PM diet, expression of SOD was also downregulated at week 8 but elevated again by week 12 (Fig. 1B). The effect of strain was significant on GPx expression in the intestine over time with the FM diet (Fig. 1C). Expression of GPx in the intestine with the PM diet was variable among strains within time points but not significant over time (Fig. 1D). Catalase expression in the intestine increased significantly over time in RBT3 with both FM and PM dietary treatments (Fig. 1E and F). Catalase expression was also elevated in RBT2 over time in the PM diet treatment (Fig. 1F).



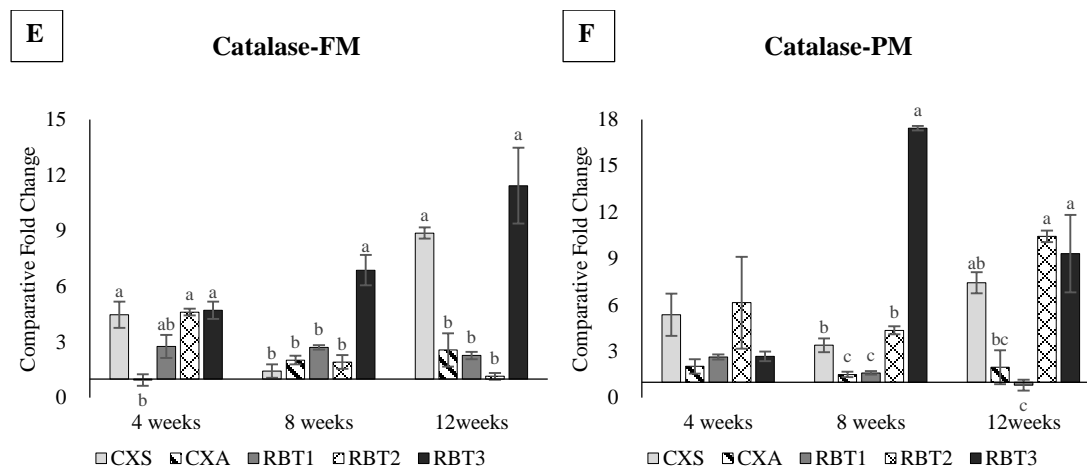


Figure 1. Comparative fold change of gene expression in distal intestine of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

In the liver, SOD expression was downregulated among strains on both diets except for RBT3 which showed increased expression by week 12 on the FM diet (Fig. 2A) and week 8 on the PM diet (Fig. 2B). The RBT2 strain also showed increased expression at week 12 on the PM diet (Fig. 2B). The expression of GPx was significantly different over time with all strains on both the FM and PM diets with lower expression again observed at week 8 (Fig. 2C and D). A significant time effect was present with the expression of catalase in both FM and PM diets, with higher expression at week 4 and expression diminishing to initial levels (time 0) by week 8 in both diets (Fig. 2E and F).

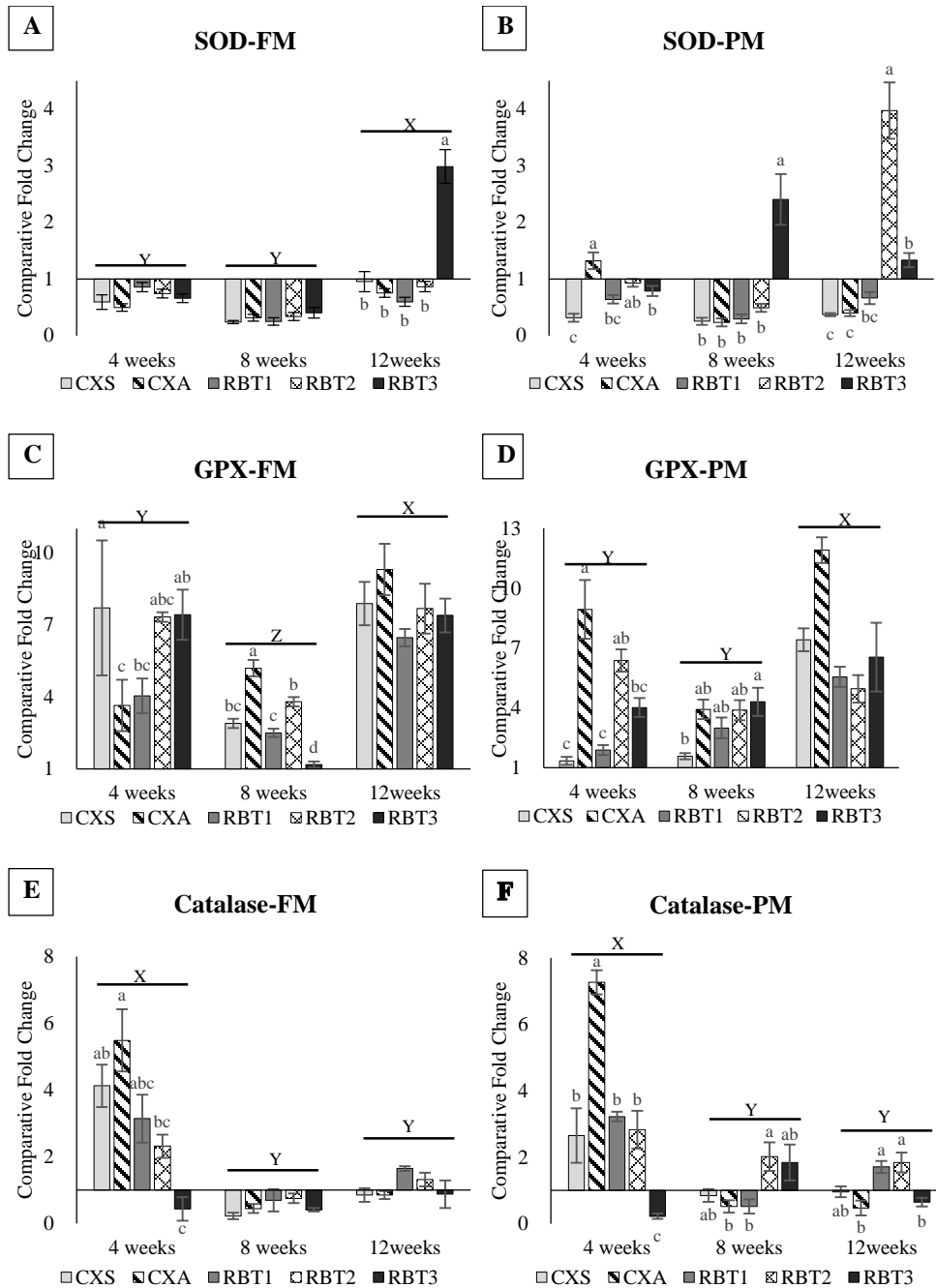


Figure 2. Comparative fold change of gene expression in the liver of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

Strain and time effect were significant for expression of S100I2 in the intestine of fish fed both FM and PM diets. Overall expression was lower by week 8 with significant upregulation of S100I2

observed in RBT1 in week 12 on both diets (Fig. 3A and B). Both strain and time effect were significant with expression of S100V2 in the liver of fish fed the FM and PM (Fig. 4A and B). Overall expression was higher at week 4 and diminished over time in all strains by week 12.

4. Discussion

Rainbow trout selected for increased utilization of plant protein diets (CXS, CXA) showed superior growth compared to the other commercial strains (RBT1, RBT2, and RBT3) on both FM and PM diets after twelve weeks (Table 3). Similar results have been observed in previous feeding trials using this selected strain when fishmeal was replaced with up to 40% SBM (Blaufuss *et al.*, 2019; 2020; Overturf *et al.*, 2013). Advantages of these selected rainbow trout was first reported by Venold *et al.*, 2012, where they examined the level of fatty acid binding protein and enterocyte proliferation rate to define the different responses with 4th generation CX select line fish and non-selected rainbow trout. Callet *et al.*, 2021 recently showed transcriptome profiles differ along with growth performance within three isogenic lines of RBT with varying sensitivity to SBM suggesting sufficient genetic variation is present in RBT lines to perhaps select for further improvement in oral tolerance of SBM.

Maintaining homeostasis with variable generation of reactive oxygen species (ROS) is important for preventing oxidative injury and is maintained by superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase as the first line of antioxidant defense reducing the oxidative stress in an organism (Hoseinifar *et al.*, 2021; Livingstone, 2003). SOD, GPx and catalase are easily induced by oxidative stress, therefore their expression and enzyme activities have been used as a biomarkers to define oxidative stress in cells (van der Oost *et al.*, 2003). Anti-nutritional factors found in SBM have been linked to damage of the antioxidant system in fish (Zhang *et al.*, 2013).

In the distal intestine, we observed significant up-regulation in expression of the SOD gene in fish fed with the FM or PM diet (Fig. 1A and B). At week 8, both diet and strains showed lower SOD expression than at other time points. This up and down regulation over time has been previously observed (Blaufuss *et al.* 2019) and may indicate an adaptive response by the fish to the experimental and control diets which are different than the diet fish were fed prior to the study. The CXA and RBT1 strain showed greater expression of SOD than other strains in week 4 while fed FM diet but this pattern was unresolved by week 12. The expression of GPx in the distal

intestine was highly variable and showed overall down-regulation regardless of the diet or strain (Fig. 1C and D). At week 12, CXS and CXA fish on both FM and PM diets showed up-regulation in GPx in the distal intestine. The expression of catalase data in the distal intestine was observed a significant effect between strain and up-regulation among all-time points in FM or PM diets. Catalase expression generally increased over time but interestingly, expression differences were significant between CXS and CXA strains on both diets at all time points (Fig. 1E and F). This suggests that despite these fish being from the same cohort and same strain, significant differences remain in genetic variability between families and expression of catalase can be very time and age dependent. Comparison to similar work shows intestinal antioxidant activity was significantly higher in largemouth bass after 8 weeks fed a 28% SBM diet. Specifically, bass fed on a high-SBM diet showed about two-fold greater activity of SOD and GPx in the intestine than bass fed an FM diet (Chen *et al.*, 2021). In addition, Blaufuss *et al.*, (2019) observed up-regulation in other genes related to inflammation in distal intestine of RBT while fed a 40% SBM diet. In that study, upregulation of IL-17 was related to the commonly observed mucosal inflammatory response in salmonids. RBT fed on a 40% SBM diet showed greater expression on IL-17A/F2a, F2b, and F3 than the RBT fed an FM diet at weeks 4, 8, and 12 (Blaufuss *et al.*, 2019).

Expression of SOD in the liver showed down-regulation at weeks 4 and 8 among all strains of fish fed the FM diet (Fig. 2A). In general, variable expression of SOD in the liver was only observed in RBT2 and RBT3 of the commercial strains with both CXS and CXA fish remaining unaffected by dietary treatment. In gilthead sea bream, SOD antioxidant enzyme activity in the liver increased significantly as the FM percentage in the diet was replaced with SBM (Kokou *et al.*, 2015). The expression of SOD in the liver of Atlantic salmon was down regulated after 2 days and 17 days when the diet was changed from FM to a plant-based diet (Olsvik *et al.*, 2011). With GPx gene expression in the liver, we observed significant differences across all-time points in with fish fed the FM diet. Expression of GPx in fish fed the PM diet was variable but generally downregulated from the initial time point (time 0) (Fig. 2C and D). Both the CXS and CXA strains showed modest but significantly increased expression of GPx at week 12 regardless of diet. Previously, GPx upregulation in the liver has not been observed as a hallmark for this strain. Expression of GPx in the liver of Atlantic salmon was shown to be elevated at 17 days after FM was replaced with a plant-based diet but not on day 0 and 2 (Olsvik *et al.*, 2011). This shortened timeline may also be true for rainbow trout but we did not sample fish at two weeks.

Catalase expression in the liver was variable with both time and strain and there was a general tendency for upregulation of catalase by week 12 regardless of diet. Catalase expression between the CXA and CXS was significantly different by week 12 again suggesting as observations of GPx expression did, that age and size differences between these cohorts of the same strain convey significantly different responses to the same diet. In the liver of Atlantic salmon, increases in expression and enzyme activity of catalase was positively correlated with a plant-based diet after day 17 (Olsvik *et al.*, 2011). Catalase processes H₂O₂ to water, but GPx can also reduce lipid peroxides (Ighodaro & Akinloye, 2018). The patterns of SOD, GPx and catalase expression observed between diets and among strains may indicate variation in changes to metabolism that strains encounter over time as they detoxify H₂O₂ or reduce fatty acid peroxides.

Information on S100 gene expression in fish is limited. Calcium-binding proteins are found in the skin and mucus membranes of Atlantic salmon in both sea lice infected and non-infected fish. One of these proteins, S100I2, has been identified as ictacalcin (Easy & Ross, 2009). Channel catfish skin has been shown to have abundant S100-like calcium-binding proteins with ictacalcin comprising up to 5% of these proteins (Karsi *et al.*, 2002). Physiological relationships between adaptation to a marine environment and calcium-binding protein expression in the gut remains unclear. In marine fish, the major area of calcium uptake and homeostasis is in the gut, and thus S100 gene expression could be important when feeding anadromous RBT or Atlantic salmon feeds that contain high levels of SBM (Gregório & Fuentes, 2018). Previous work has shown the expression of calcium-binding protein genes (S100 genes) are affected by high SBM diets in RBT (Blaufuss *et al.*, 2019, 2020). In this study, expression S100I2 in the distal intestine showed a similar pattern to SOD expression over time and GPx expression over time in the liver, with overall lower expression at week 8 regardless of diet (Fig. 3A and B). Initially at week 4, S100I2 expression in both CXS and RBT1 strains was significantly upregulated regardless of diet but remained higher only in the commercial RBT1 strain after week 12. The same commercial strain of RBT was also used in a previous study (RBT1) and was observed with elevated S100I2 expression fed a high-SBM diet in that study (Blaufuss *et al.*, 2020). In the distal intestine, the CXS strain showed greater expression of S100I2 than CXA strain fed regardless of diet.

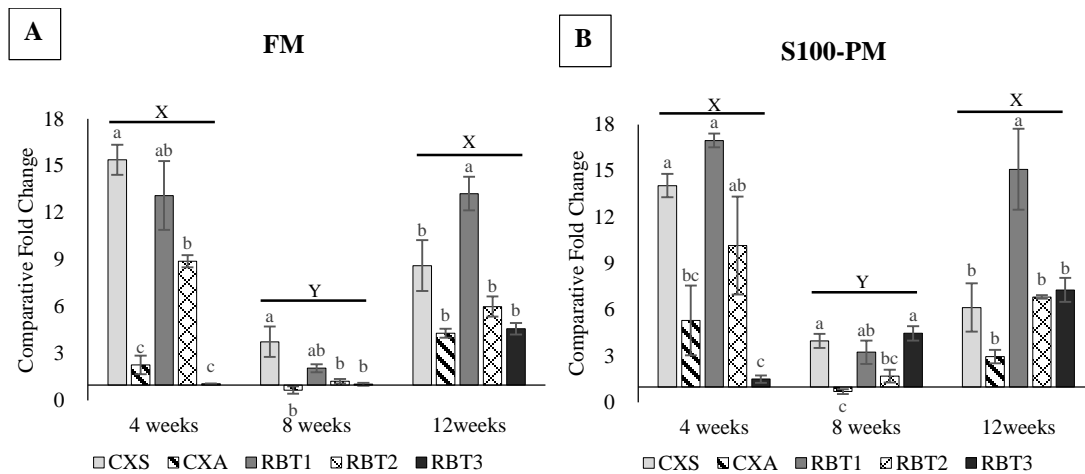


Figure 3. Comparative fold change of S100I2 gene expression in the intestine of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

In previous work, S100V2 gene upregulation was observed in the liver when RBT were fed a high-SBM diet (Blaufuss et al., 2019). In this study, expression of S100V2 in the liver showed a similar pattern to catalase gene expression with greater expression at week 4 regardless of diet and an overall down regulation at weeks 8 and 12 (Fig. 4 A and B).

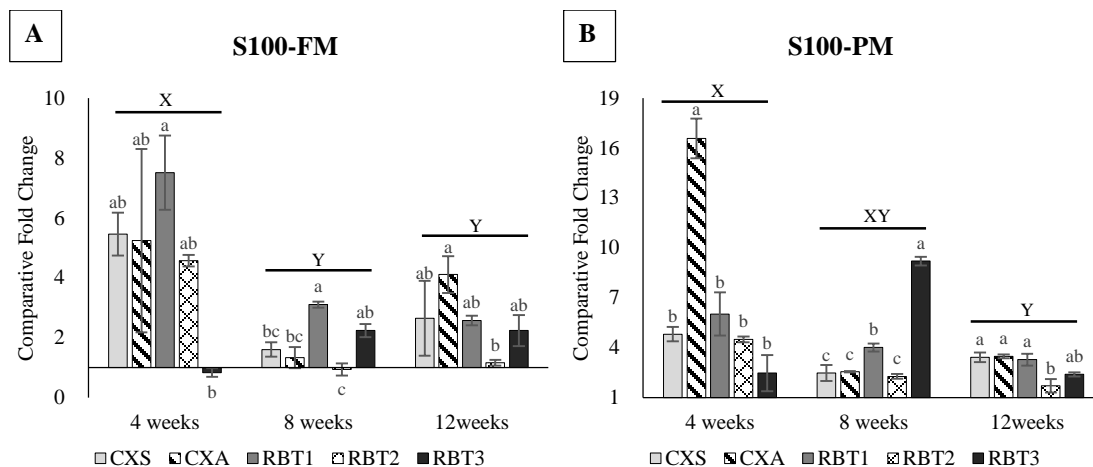


Figure 4. Comparative fold change of S100V2 gene expression in the liver of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

Conclusions

In summary, our results demonstrate significant growth differences between the CX strain selected for growth on a plant protein-based diet using 40% SBM and current commercial strains. Callet *et al.*, (2021) also observed different levels of energy production in RBT fed on a plant-based diet with numerous genetic differences between the isogenic lines. Moreover, the CXS and CXA groups were the same strain, same cohort but only different in spawning age and showed significant differences in gene expression on the same diet at the same time points. Thus, age and timing of sampling needs further study and must be taken into consideration when doing comparative studies.

Acknowledgments

We would like to thank the hatchery staff, Tim Boyle and Julie Browning, at the Hagerman Fish Culture Experiment Station for their help with culturing fish. The work was funded by USDA, Hatch funds to MSP.

References

- Baeverfjord, G., & Krogdahl, A. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, *19*(5), 375–387. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1996.d01-92.x>
- Balasubramanian, M. N., Panserat, S., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Montfort, J., Le Cam, A., Medale, F., Kaushik, S. J., & Geurden, I. (2016). Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC Genomics*, *17*(1), 449. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2804-1>
- Blaufuss, P. C., Bledsoe, J. W., Gaylord, T. G., Sealey, W. M., Overturf, K. E., & Powell, M. S. (2020). Selection on a plant-based diet reveals changes in oral tolerance, microbiota and growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) when fed a high soy diet. *Aquaculture*, *525*, 735287. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735287>
- Blaufuss, P. C., Gaylord, T. G., Sealey, W. M., & Powell, M. S. (2019). Effects of high-soy diet on S100 gene expression in liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, *86*, 764–771. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.025>
- Boucher, R. L., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Kerneis, T., Goardon, L., Labbé, L., Chatain, B., Bothaire, M. J., Larroquet, L., Médale, F., & Quillet, E. (2012). Selection for Adaptation to Dietary Shifts: Towards Sustainable Breeding of Carnivorous Fish. *PLOS ONE*, *7*(9), e44898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044898>
- Burrells, C., Williams, P. D., Southgate, P. J., & Crampton, V. O. (1999). Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *72*(3), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00143-9)
- Callet, T., Dupont-Nivet, M., Danion, M., Burel, C., Cluzeaud, M., Surget, A., Aguirre, P., Kerneis, T., Labbé, L., Panserat, S., Quillet, E., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., & Médale, F. (2021). Why Do Some Rainbow Trout Genotypes Grow Better With a Complete Plant-Based Diet? Transcriptomic and Physiological Analyses on Three Isogenic Lines. *Frontiers in Physiology*, *12*, 732321. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732321>
- Callet, T., Médale, F., Larroquet, L., Surget, A., Aguirre, P., Kerneis, T., Labbé, L., Quillet, E., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., & Dupont-Nivet, M. (2017). Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLOS ONE*, *12*(10), e0186705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705>
- Chen, W., Chang, K., Chen, J., Zhao, X., & Gao, S. (2021). Dietary sodium butyrate supplementation attenuates intestinal inflammatory response and improves gut microbiota composition in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed with a high soybean meal diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, *47*(6), 1805–1819. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-01004-w>
- Cheng, Z. J., Hardy, R. W., & Usry, J. L. (2003). Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture*, *215*(1), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00166-7)
- Collins, S. A., Øverland, M., Skrede, A., & Drew, M. D. (2013). Effect of plant protein sources on growth rate in

- salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*, 400–401, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.006>
- Council, N. R., Studies, D. on E. and L., Resources, B. on A. and N., & Shrimp, C. on the N. R. of F. and. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press.
- Easy, R. H., & Ross, N. W. (2009). Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.02.001>
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals*. FAO. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540EN/>
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, 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. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J. L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C. L., & Mazurais, D. (2011). Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics*, 12(1), 522. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-522>
- Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M. N., Schrama, J. W., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Kaushik, S. J., Panserat, S., & Médale, F. (2013). The Positive Impact of the Early-Feeding of a Plant-Based Diet on Its Future Acceptance and Utilisation in Rainbow Trout. *PLOS ONE*, 8(12), e83162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083162>
- Gregório, S. F., & Fuentes, J. (2018). Regulation of Bicarbonate Secretion in Marine Fish Intestine by the Calcium-Sensing Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1072. <https://doi.org/10.3390/ijms19041072>
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2021). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(2), 198–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1795616>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Karsi, A., Cao, D., Li, P., Patterson, A., Kocabas, A., Feng, J., Ju, Z., Mickett, K. D., & Liu, Z. (2002). Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin. *Gene*, 285(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00414-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00414-6)
- Knudsen, D., Urán, P., Arnous, A., Koppe, W., & Frøkiær, H. (2007). Saponin-Containing Subfractions of Soybean Molasses Induce Enteritis in the Distal Intestine of Atlantic Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2261–2267. <https://doi.org/10.1021/jf0626967>
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M., & Kentouri, M. (2015). Effects of Fish Meal

- Replacement by a Soybean Protein on Growth, Histology, Selected Immune and Oxidative Status Markers of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(2), 115–128. <https://doi.org/10.1111/jwas.12181>
- Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M., & Bakke, A. M. (2015). Soya Saponins Induce Enteritis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3887–3902. <https://doi.org/10.1021/jf506242t>
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: An update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3), 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire (France)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Oxidative+stress+in+aquatic+organisms+in+relation+to+pollution+and+aquaculture&author=Livingstone%2C+D.R.+%28%28Plymouth+Marine+Laboratory+%28Royau+me+Uni%29%29%29&publication_year=2003
- Olsvik, P. a., Torstensen, B. e., Hemre, G.-I., Sanden, M., & Waagbø, R. (2011). Hepatic oxidative stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred from a diet based on marine feed ingredients to a diet based on plant ingredients. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e424–e436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00778.x>
- Overturf, K., Welker, T., Barrows, F., Towner, R., Schneider, R., & LaPatra, S. (2013). *Variation in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, to Biosynthesize Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid When Reared on Plant Oil Replacement Feeds*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/595974>
- Panserat, S., Hortopan, G. A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerré, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., & Corraze, G. (2009). Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*, 294(1), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.013>
- Romarheim, O. H., Øverland, M., Mydland, L. T., Skrede, A., & Landsverk, T. (2011). Bacteria Grown on Natural Gas Prevent Soybean Meal-Induced Enteritis in Atlantic Salmon. *The Journal of Nutrition*, 141(1), 124–130. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128900>
- Silva, P. F., McGurk, C., Knudsen, D. L., Adams, A., Thompson, K. D., & Bron, J. E. (2015). Histological evaluation of soya bean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Quantitative image analysis vs. semi-quantitative visual scoring. *Aquaculture*, 445, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.002>
- Turchini, G. M., Ng, W.-K., & Tocher, D. R. (Eds.). (2010). *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781439808634>
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

- Venold, F. F., Penn, M. H., Krogdahl, Å., & Overturf, K. (2012). Severity of soybean meal induced distal intestinal inflammation, enterocyte proliferation rate, and fatty acid binding protein (Fabp2) level differ between strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 364–365, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.035>
- Zhang, J.-X., Guo, L.-Y., Feng, L., Jiang, W.-D., Kuang, S.-Y., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S.-H., Tang, L., & Zhou, X.-Q. (2013). Soybean β -Conglycinin Induces Inflammation and Oxidation and Causes Dysfunction of Intestinal Digestion and Absorption in Fish. *PLOS ONE*, 8(3), e58115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058115>